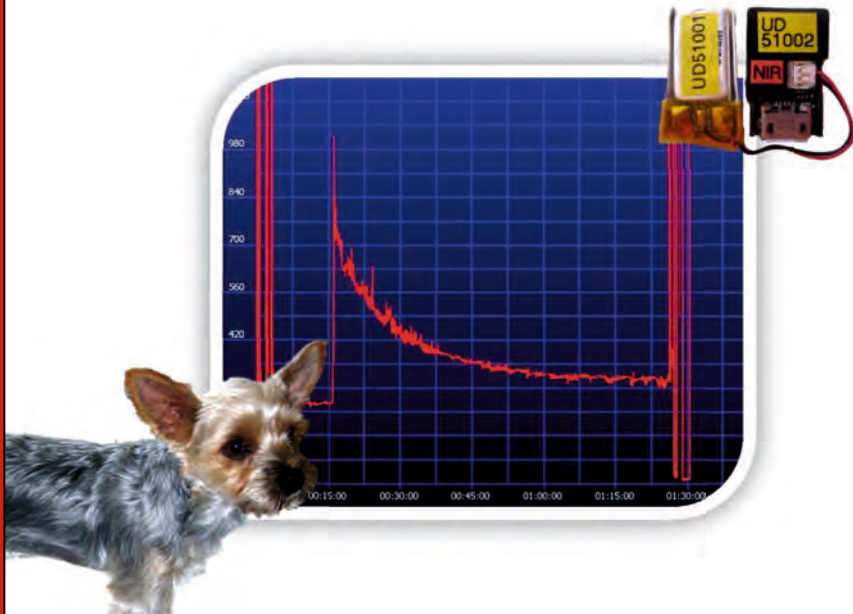


Transkutane fluorometrische Bestimmung
der Indocyaningrünelimination als dynamischer
Leberfunktionstest bei Hunden mit kongenitalem
extrahepatischem portosystemischem Shunt



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere, Innere Medizin
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Reto Neiger

**Transkutane fluorometrische Bestimmung der
Indocyaningrünelimination als dynamischer
Leberfunktionstest bei Hunden mit kongenitalem
extrahepatischem portosystemischem Shunt**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Lisa Hausmann

Tierärztin aus Darmstadt

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Reto Neiger

Prof. Dr. Melanie Hamann

Tag der Disputation: 28. März 2017

Meinen Eltern

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lisa Hausmann

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Zielsetzung	3
II	Literaturübersicht	4
1	Aufgaben der Leber	4
2	Hepatobiliäre Erkrankungen	4
3	Der portosystemische Shunt des Hundes	7
3.1	Definition	7
3.2	Ätiologie des PSS	7
3.3	Shuntmorphologie	8
3.4	Krankheitsbild	9
3.5	Diagnostik	14
3.6	Konservative Therapie	15
3.7	Verschluss des PSS	17
4	Leberfunktionsdiagnostik beim Hund	19
4.1	Hämatologische Parameter	19
4.2	Blutchemische Parameter	20
4.3	Gerinnungsparameter	25
4.4	Urinuntersuchung	26
4.5	Dynamische Leberfunktionstests	26
4.6	Sonstige Leberfunktionstests	30
5	Leberfunktionsmessung anhand der Indocyaningrünelimination	31
5.1	Indocyaningrün (ICG) als fluoreszierende Markersubstanz	31
5.2	Pharmakokinetik der ICG-Elimination	33
5.3	Messverfahren der ICG-Elimination	38
5.4	Messgrößen der ICG-Elimination	40
5.5	Bedeutung der ICG-Elimination in der Leberfunktionsdiagnostik	43
III	Material und Methoden	45
1	Patientenauswahl	45

2	Voruntersuchungen	46
2.1	Anamnese und allgemeine Untersuchung	46
2.2	Laboruntersuchungen.....	46
2.3	Sonographie	47
3	Messung der ICG-Elimination.....	48
3.1	Vorbereitung des Hundes	48
3.2	Aufbau der Devices	48
3.3	Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination	49
3.4	Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben.....	51
4	Chirurgischer Verschluss des portosystemischen Shunts	52
5	Beurteilung des Verschlussgrades des ePSS.....	53
6	Statistische Auswertung	54
6.1	Laboruntersuchungen.....	54
6.2	ICG-Elimination.....	54
IV	Ergebnisse.....	58
1	Patientengut.....	58
2	Laboruntersuchungen.....	60
2.1	Hämatologische Parameter	60
2.2	Blutchemische Parameter	63
2.3	Gallensäurenstimulationstest und Ammoniaktoleranztest.....	66
3	ICG-Elimination.....	69
3.1	Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination	69
3.2	Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben.....	81
3.3	Vergleich von invasiver und transkutaner Messmethode.....	87
V	Diskussion.....	91
1	Studiendesign	91
2	Patientengut.....	92
3	Laboruntersuchungen.....	92
3.1	Hämatologische Parameter	92
3.2	Blutchemische Parameter	92

3.3	Gallensäurenstimulationstest und Ammoniaktoleranztest.....	93
4	ICG-Elimination.....	94
4.1	Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination	94
4.2	Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben.....	96
4.3	Korrelation von invasiver und transkutaner Messmethode	98
4.4	Interpretation der Resultate von Hund 3.....	100
4.5	Evaluation von HWZ, PDR und R15 im Vergleich zur Literatur	101
4.6	Einfluss der verwendeten ICG-Dosierung	102
4.7	Einsatzmöglichkeiten in der Leberfunktionsdiagnostik.....	102
5	Ausblick	105
VI	Zusammenfassung	106
VII	Summary.....	109
VIII	Literaturverzeichnis.....	111
IX	Anhang.....	130

Abkürzungsverzeichnis

Alb	Albuminkonzentration
ATT	Ammoniaktoleranztest
Bili	Bilirubinkonzentration
BKG	Background
Chol	Cholesterinkonzentration
CHr	Hämoglobingehalt der Retikulozyten (reticulocyte hemoglobin content)
cPSS	kongenitaler portosystemischer Shunt (congenital portosystemic shunt)
EDTA	Etyhlendiamintetraessigsäure
ePSS	extrahepatischer portosystemischer Shunt
Glu	Glukosekonzentration
GS-0	präprandiale Serumgallensäurenkonzentration
GS-2	Serumgallensäurenkonzentration zwei Stunden nach Fütterung
GST	Gallensäurenstimulationstest
HES	Hepatoenzephales Syndrom
Hkt	Hämatokrit
HWZ	Halbwertszeit
ICG	Indocyaningrün
Index Se	ermittelt aus Serum-ICG-Elimination durch serielle Blutprobenentnahme
Index tk	ermittelt aus transkutan fluorometrisch bestimmter Blut-ICG-Elimination
iPSS	intrahepatischer portosystemischer Shunt
k	fraktionelle Extraktion
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume)
NH ₃	Ammoniak
NH ₃ -0	basale Blutammoniakkonzentration
NH ₃ -30	Blutammoniakkonzentration 30 Minuten nach oraler Ammoniumchloridgabe
NH ₃ -45	Blutammoniakkonzentration 45 Minuten nach oraler Ammoniumchloridgabe
NH ₄ ⁺	Ammoniumion

PDR	Plasmaverschwinderate (plasma disappearance rate)
PSS	portosystemischer Shunt
PSVA	portosystemische vaskuläre Anomalien
R15	15-Minuten-Retentionsrate
R^2	Determinationskoeffizient
R30	30-Minuten-Retentionsrate
RBC	Erythrozytenzahl (red blood cell count)
T_{inj}	Zeitpunkt der intravenösen ICG-Injektion
T_x	Zeitpunkt x Minuten nach intravenöser ICG-Injektion
Urea	Harnstoffkonzentration
Y_0	extrapolierte Signalstärke zum Zeitpunkt der ICG-Injektion

I Einleitung

Es existiert eine Vielzahl an Lebererkrankungen beim Hund, die zu einer Leberfunktionsstörung führen können (Richter, 2003; Rothuizen et al., 2006). Die Folgen einer solchen Leberinsuffizienz sind unter anderem eine verminderte Proteinsynthese, Koagulopathien, eine Immunsuppression sowie eine mangelnde Entgiftung toxischer Metabolite (Richter, 2003; Akhavan und Lingappa, 2007; Neumann, 2013a; Weingarten und Sande, 2015). Erhöhte Blutkonzentrationen an Neurotoxinen wie Ammoniak können im fortgeschrittenen Krankheitsstadium ein hepatoenzephalos Syndrom (HES) auslösen (Richter, 2003).

Der portosystemische Shunt (PSS) stellt eine der wichtigsten Leberfunktionsstörungen beim Hund dar. Er beschreibt ein abnormes Verbindungsgefäß zwischen dem Pfortadersystem, das der Leber venöses Blut aus den Abdominalorganen zuführt, und der systemischen venösen Zirkulation. Infolgedessen kann der Blutfluss die Lebersinusoide umgehen und die Leber sich nur eingeschränkt entwickeln (Starzl et al., 1973; Watson und Herrtage, 1998; Winkler et al., 2003; Szatmári und Rothuizen, 2006; Paepe et al., 2007a). Man unterscheidet zwischen dem kongenitalen PSS (cPSS) und dem erworbenen PSS infolge einer portalen Hypertension (Cullen et al., 2006; Paepe et al., 2007a; Adam et al., 2012). Bei der kongenitalen Form handelt es sich um die häufigste angeborene hepatobiliäre Erkrankung und die häufigste Ursache eines HES beim Hund (Center und Magne, 1990; Broome et al., 2004; Lidbury et al., 2015). Der cPSS gliedert sich auf in extrahepatisch (ePSS) und intrahepatisch (iPSS) gelegene Shuntgefäße. Das Krankheitsbild umfasst allgemeine Symptome wie Wachstumsretardierung, verminderte Körperkondition und Fieber, neurologische Symptome wie Drangwandern, Somnolenz und Desorientierung, gastrointestinale Symptome wie Erbrechen und Durchfall sowie urologische Symptome wie Polyurie, Polydipsie und Urolithiasis (Johnson et al., 1987; Center und Magne, 1990; Winkler et al., 2003; Mehl et al., 2005; Adam et al., 2012; Caporali, et al., 2015). Es ist nicht spezifisch für den cPSS, sondern gilt in ähnlicher Form auch für andere Leberfunktionsstörungen (van den Ingh et al., 1995; van Straten et al., 2015). Konservativ wird eine medikamentelle und diätetische Therapie eingesetzt (Taboada und Dimski, 1995; Center, 1998; Watson und Herrtage, 1998; Proot et al., 2009). Daneben kann eine Heilung durch einen – meist langsam progressiven – Verschluss des Shuntgefäßes angestrebt werden (Hunt und Hughes, 1999; Winkler et al., 2003; Broome et al., 2004). Für den cPSS des Hundes liegen eine vergleichsweise gute Datenlage und gute therapeutische Optionen vor, sodass er sich als Modellerkrankung einer Leberfunktionsstörung eignet.

Viele Parameter der Leberfunktionsdiagnostik sind ebenfalls am Beispiel des PSS beschrieben. Bei Verdacht auf eine Leberdysfunktion können erste Hinweise anhand der hämatologischen und blutchemischen Untersuchung gewonnen werden. Typischerweise führt eine eingeschränkte Leberfunktion zu einer mikrozytären Anämie und zu erniedrigten

Serumkonzentrationen an Albumin, Harnstoff, Cholesterin und Glukose. Im Falle einer Cholestase kommt eine Hyperbilirubinämie hinzu (Center und Magne, 1990; Meyer und Harvey, 1994; Mwanza et al., 1997; Simpson et al., 1997; Niles et al., 2001; Paepe et al., 2007b; Neumann, 2010; Adam et al., 2012; Elhiblu et al., 2015). Die Urinuntersuchung und Gerinnungstests zeigen ebenfalls klassische Veränderungen (Center und Magne, 1990; Broome et al., 2004; Kummeling et al., 2006; Neumann, 2010; Weingarten und Sande, 2015). Zur näheren Evaluation der Leberfunktion stehen mit der Bestimmung der Serumgallensäurenkonzentration und der Ammoniakkonzentration aus Vollblut oder Serum sensitivere und spezifischere Tests zur Verfügung. Sie können auch in Form eines Gallensäurenstimulationstests (GST) oder Ammoniaktoleranztests (ATT) eingesetzt werden (Center, 1990; Center, 1996; Turgut et al., 1997; Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland, 2009; Neumann, 2013a; van Straten et al., 2015). Diese beiden dynamischen Leberfunktionstests sind jedoch nur am wachen, nicht stuporösen Patienten anwendbar, die Resultate sind meist nicht unmittelbar verfügbar, das Probenhandling ist im Falle der Ammoniakmessung sehr anspruchsvoll und die Analyse daher fehleranfällig.

In der Humanmedizin gewinnt die Indocyaningrünelimination in der Leberfunktionsdiagnostik zunehmend an Bedeutung. Indocyaningrün (ICG) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der seit mehreren Jahrzehnten regelmäßig in der medizinischen Diagnostik eingesetzt, ausschließlich über die Leber ausgeschieden wird und zur intravenösen Injektion beim Menschen zugelassen ist (Cherrick et al., 1960; Alander et al., 2012; Halle et al., 2014). Traditionell wurde eine invasive Messung der ICG-Elimination über serielle Blutprobenentnahmen oder über das Legen eines fiberoptischen Katheters vorgenommen. Mittlerweile ist eine transkutane pulsdensitometrische Messung etabliert, bei der die Abnahme der Farbstoffkonzentration im Blut spektrophotometrisch über einen Ohr- oder Fingerclip gemessen wird (Sakka et al., 2000; Faybik et al., 2004; Faybik und Hetz, 2006; Sakka und van Hout, 2006). Verschiedene Studien belegen die herausragende diagnostische und prognostische Bedeutung der ICG-Elimination für die allgemeine Hepatologie, die Transplantationsmedizin und die Überwachung von kritisch kranken Patienten oder Patienten in Anästhesie im Vergleich zu anderen etablierten Leberfunktionsparametern (Kimura et al., 2001; Sakka et al., 2002; Hetz et al., 2006; Hori et al., 2006; Thümer et al., 2007; Merle et al., 2009; Sheng et al., 2009; Lisotti et al., 2014; Thomas et al., 2015; Cheng et al., 2016).

Für den Hund ist die invasive Messung der ICG-Elimination mittels serieller Blutprobenentnahme seit langer Zeit etabliert, rückte jedoch mit Einführung von praktikableren Tests wie GST und ATT in den Hintergrund (Center et al., 1983; Kawasaki et al., 1984; Center, 1996). Die Entwicklung transkutaner Messverfahren eröffnet hingegen neue Möglichkeiten. Grobelna et al. (2016) untersuchten den Einsatz eines kommerziell erhältlichen spektrophotometrischen Systems aus der Humanmedizin bei acht gesunden Beagle in Anästhesie und in der Aufwachphase, mit teilweise vielversprechenden und teilweise

ungenügenden Ergebnissen. In Zusammenarbeit mit der Mannheim Pharma und Diagnostics GmbH und dem Zentrum für Medizinische Forschung der medizinischen Fakultät Mannheim wurde in der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen ein neues System zur transkutanen fluorometrischen Detektion der ICG-Elimination bei gesunden Hunden und Katzen eingesetzt und die optimale ICG-Dosierung und Lokalisation der Messeinheit (Device) ermittelt (Strommer et al., 2015). Untersuchungen zur transkutan gemessenen ICG-Elimination bei Hunden mit Leberfunktionsstörung liegen bislang nicht vor.

1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Anwendbarkeit des neu entwickelten Systems zur transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination bei Hunden mit einem ePSS vor und nach Verschluss des Shuntgefäßes im Vergleich zum Goldstandard, der invasiven Messung mittels seriell entnommener Blutproben, zu überprüfen. Es soll ein Verfahren zur Auswertung der transkutan gemessenen Eliminationskurven entwickelt werden. Anhand dessen soll der Unterschied vor und nach Verschluss des Shuntgefäßes beziehungsweise die Unterscheidbarkeit zwischen offenem und verschlossenem PSS untersucht werden.

Die Hypothese dieser Studie ist, dass eine gute Korrelation zwischen transkutan fluorometrisch und invasiv gemessener ICG-Elimination besteht, die ICG-Elimination nach Verschluss des Shuntgefäßes schneller verläuft und anhand der transkutanen fluorometrischen Messung eine Unterscheidung zwischen offenem und verschlossenem PSS möglich ist.

II Literaturübersicht

1 Aufgaben der Leber

Die Leber nimmt viele wichtige Aufgaben im Organismus wahr. So stellt sie das zentrale Stoffwechselorgan im Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidmetabolismus dar (Neumann, 2013a). Sie ist unter anderem zuständig für die Synthese von Albumin, Cholesterin oder Gerinnungsfaktoren (Akhavan und Lingappa, 2007; Neumann, 2010) und maßgeblich an der Detoxifikation endogener Stoffwechselprodukte wie Ammoniak oder exogener Substanzen und Toxine, darunter viele Medikamente, beteiligt. (Richter, 2003; Weingarten und Sande, 2015). Neben dem Abbau von Hämoglobin zu Bilirubin spielt sie auch eine wichtige endokrinologische Rolle im Rahmen der Clearance von Hormonen wie Kortisol (Richter, 2003). Desweiteren beherbergt sie mit dem retikuloendothelialen System ein zentrales immunologisches Element, das vor Bakterien oder Entotoxinen aus dem Gastrointestinaltrakt schützt (Richter, 2003; Weingarten und Sande, 2015).

2 Hepatobiliäre Erkrankungen

Entsprechend der World Small Animal Veterinary Association (WSAVA)-Richtlinien von 2006 werden Lebererkrankungen grundsätzlich in vaskuläre Erkrankungen, Erkrankungen des Gallengangssystems, Leberparenchymerkrankungen und Neoplasien unterteilt (Rothuizen et al., 2006). Eine tabellarische Übersicht findet sich im Folgenden. Grundsätzlich führt nur ein kleiner Anteil dieser Erkrankungen zu einer relevanten Einschränkung der Leberfunktion.

Tabelle II-1: Übersicht über die hepatobiliären Erkrankungen (Rothuizen et al., 2006)

1. vaskuläre Lebererkrankungen	
kongenitaler portosystemischer Shunt (cPSS)	
Stauungsleber	ausgehend von Herz, <i>Vena cava caudalis</i> , Lebervenen
portale Hypertension häufig mit sekundär erworbenen portosystemischen Shunts (PSS)	<u>primär vaskulär:</u> - Pfortaderobstruktion - primäre Pfortaderhypoplasie (nicht-zirrhotische portale Hypertension) - intrahepatische arteriovenöse Fisteln <u>primär hepatisch:</u> Folge chronischer Lebererkrankungen wie Zirrhose, ...
sonstige	z. B. Thrombophlebitis der Pfortader, ...

2. biliäre Erkrankungen	
zystische Erkrankungen und biliäre Atresie	solitäre Zysten kongenitale zystische Lebererkrankungen biliäre Atresie
Cholestase (Bilirubinostase) und Cholat-Stase	intrahepatische Cholestase extrahepatische Cholestase Cholat-Stase
Cholangitis	neutrophile Cholangitis lymphozytäre Cholangitis destruktive Cholangitis chronische Cholangitis durch Leberegelbefall
Erkrankungen der Gallenblase	zystische muzinöse Hyperplasie Cholezystitis Gallenblaseninfarkt
3. Leberparenchymerkrankungen	
reversibler hepatozellulärer Schaden	Zellschwellung, Steroid-induzierte Hepatopathie, hepatische Lipidose
Leberamyloidose	
Leberzellapoptose und –nekrose führt i. d. R. zu akuter Hepatitis	Hypoxie Toxine (Carprofen, Blaualgen, grüner Knollenblätterpilz, Acetaminophen, ...) Mikroorganismen u. a.
Hepatitis und Zirrhose	akute Hepatitis (CAV-1, Herpesviren, Leptospirose, Septikämie, ...) chronische Hepatitis (Kupfer-assoziierte chron. Hepatitis, ...) Leberzirrhose (Lobular-dissecting- Hepatitis, superfizielle nekrolytische Dermatitis, ...) unspezifische reaktive Hepatitis eosinophile Hepatitis
Leberabszesse und –granulome	
Speicherkrankheiten	Kupferspeicherkrankheit, ...
Verschiedenes	extramedulläre Hämatopoese, Lipogranulome, ...

4. Neoplasien der Leber	
hepatozelluläre Neoplasien	noduläre Hyperplasie hepatozelluläres Adenom/ Karzinom
cholangiozelluläre Neoplasien	Gallengangsadenom, Gallengangskarzinom, ...
Leberkarzinoide und Hepatoblastome	
vaskuläre und mesenchymale Neoplasien	Hämangiosarkom, Myelolipom, Fibrosarkom, ...
hämatopoetische Neoplasien	malignes Lymphom, maligne Histiozytose, Mastzelltumor, ...
Metastasen	

3 Der portosystemische Shunt des Hundes

Der portosystemische Shunt (PSS) stellt eine der häufigsten Erkrankungen mit eingeschränkter hepatobiliärer Funktion und die häufigste portosystemische vaskuläre Anomalie (PSVA) des Hundes dar (Center und Magne, 1990). Als Grundlage von Studien zur Leberfunktionsdiagnostik beim Hund bietet sich der PSS an, da eine verhältnismäßig gute Vergleichbarkeit und Standardisierbarkeit gegeben ist. Im Gegensatz zu anderen hepatobiliären Erkrankungen sind konkurrierende Erkrankungen seltener (Metastasierung von hepatischen Neoplasien, Cholestase, Pankreatitiden, Häufung von Erkrankungen beim älteren Patienten). Das meist junge Alter der Patienten und die potentielle Reversibilität der Veränderungen nach erfolgreichem Verschluss des Shuntgefäßes fördern eine gute Besitzercompliance und Nachverfolgbarkeit der Patienten. Diese Faktoren haben dazu geführt, dass für den PSS die mit Abstand beste Datenlage im Vergleich zu anderen Leberfunktionsstörungen vorliegt.

Die nachfolgenden Kapitel beschäftigen sich mit dem kongenitalen portosystemischen Shunt (cPSS) als Beispiel einer Leberfunktionsstörung beim Hund, da sie aus oben genannten Gründen als Modellerkrankung in der vorliegenden Studie dient.

3.1 Definition

Der PSS bezeichnet ein abnormes Verbindungsgefäß zwischen dem Pfortadersystem, das der Leber venöses Blut aus den Abdominalorganen (insbesondere dem Gastrointestinaltrakt) zuführt, und der systemischen venösen Zirkulation, sodass der Blutfluss die Lebersinusoide umgehen kann (Watson und Herrtage, 1998; Winkler et al., 2003; Szatmári und Rothuizen, 2006; Paepe et al., 2007a).

3.2 Ätiologie des PSS

Je nach der Ätiologie werden kongenitale und erworbene Shuntformen unterschieden.

Der cPSS tritt in der Regel solitär auf, vereinzelt wurden auch zwei oder mehr Shuntgefäße bei einem Hund nachgewiesen (Winkler et al., 2003; Paepe et al., 2007a). Sie werden entsprechend ihrer Lage in extra- und intrahepatische Shuntformen unterteilt (Kapitel 3.3). Insgesamt handelt es sich beim cPSS um eine seltene Erkrankung. Er stellt jedoch die häufigste Anomalie des hepatobiliären Systems (Center und Magne, 1990) und die häufigste Ursache eines hepatoenzephalen Syndroms (HES) bei Hund und Katze dar (Broome et al., 2004; Lidbury et al., 2015). Zwischen 1980 und 2001 nahm der Anteil an Fällen angeborener PSS beim Hund in der Veterinary Medical Database (VMDB), in der Krankheitsfälle verschiedener nordamerikanischer Universitätskliniken registriert werden, von 0,05 % auf 0,5 % stetig zu (Tobias und Rohrbach, 2003). Diese Beobachtung wurde nur zum Teil einer steigenden Aufmerksamkeit der Tierärzteschaft zugesprochen.

Auffällig war in dieser Untersuchung eine deutliche Häufung bestimmter Rassen: Havaneser, Yorkshire Terrier, Malteser, Dandie Dinmont Terrier, Mops, Skye Terrier, Miniatur Schnauzer, langhaariger Chihuahua, Scottish Deerhound sowie Standard Schnauzer (Tobias und Rohrbach, 2003). Rassehunde scheinen gegenüber Mischlingshunden für PSVA prädisponiert zu sein (Center und Magne, 1990). Es wird von einer hereditären Genese des cPSS ausgegangen, auch wenn Umweltfaktoren ursächlich nicht sicher ausgeschlossen werden können (Paepe et al., 2007a). Für einige Rassen konnte eine hereditäre Komponente gezeigt werden, jedoch ohne spezifischen Vererbungsnachweis. So ist für den Yorkshire Terrier eine Rasseprädisposition mit einer mehr als 11-fach höheren Häufigkeit belegt (Tobias, 2003). Beim Cairn Terrier ist eine Heritabilität mit familiären Prävalenzen von bis zu 5,9 % nachgewiesen (van Straten et al., 2005). Ebenso liegt eine familiäre Häufung mit Evidenz einer genetischen Grundursache beim Irischen Wolfshund vor, wobei verschiedene intrahepatische Shuntformen auftreten können (Meyer et al., 1995; van Steenbeek et al., 2009). Eine Geschlechtsprädisposition konnte bisher nicht nachgewiesen werden (van Straten et al., 2005; Paepe et al., 2007a; van Steenbeek et al., 2009).

Im Gegensatz zu der kongenitalen Form entstehen erworbene PSS kompensatorisch infolge einer portalen Hypertension. Grunderkrankungen können beispielsweise Leberparenchymerkrankungen (chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Neoplasien der Leber), Pfortaderthrombosen oder vaskuläre Anomalien mit sekundärer portaler Hypertension (arteriovenöse Fisteln, nicht-zirrhatische portale Hypertension) sein (d'Anjou, 2007; Berent und Weisse, 2010). Die Druckerhöhung im portalen System führt innerhalb von fünf bis 14 Wochen zur Öffnung multipler Kollateralgefäße, die typischerweise extrahepatisch, in großer Anzahl und mit gewundenem Verlauf überwiegend im Bereich der linken Niere liegen und einen Druckausgleich mit dem systemischen venösen System ermöglichen (Van Winkle und Bruce, 1993; Szatmári und Rothuizen, 2006; d'Anjou, 2007; Berent und Weisse, 2010; Buob et al., 2011). Aufgrund des erhöhten hydrostatischen Druckes im Pfortadersystem entsteht bei den betroffenen Hunden regelmäßig Aszites, während dieser bei einem cPSS unüblich ist (Buob et al., 2011; Adam et al., 2012).

Die folgenden Kapitel beschränken sich, sofern nicht anders angegeben, ausschließlich auf den cPSS.

3.3 Shuntmorphologie

In der Literatur existieren verschiedene Einteilungssysteme für angeborene portosystemische Shuntverbindungen.

Grundsätzlich kann unterschieden werden zwischen intrahepatischen Shuntformen (iPSS), die ihren Ursprung im rechten oder linken Pfortaderast innerhalb der Leber

haben, und extrahepatischen Shuntformen (ePSS), die von außerhalb der Leber gelegenen Anteilen des Pfortaderkreislauf ausgehen (Szatmári und Rothuizen, 2006). Der iPSS tritt insbesondere bei großwüchsigen Hunderassen (Berner Sennenhund, Golden Retriever, Labrador Retriever, Irischer Wolfshund) beziehungsweise Mischlingshunden auf, während ePSS eher den kleinwüchsigen Rassen (Mops, Yorkshire Terrier, Dackel) und Mischlingshunden vorbehalten sind (Bostwick und Twedt, 1995; van den Ingh et al., 1995; Broome et al., 2004; d'Anjou et al., 2004; Hunt, 2004; Szatmári und Rothuizen, 2006; Berent und Weisse, 2010).

Der iPSS verbindet den rechten oder linken Pfortaderast über eine Lebervene, seltener auch direkt den intrahepatischen Pfortaderstamm, mit der *Vena cava caudalis*. Er wird dementsprechend anhand der Lokalisation näher charakterisiert als linksseitiger (entspricht dem persistierenden *Ductus venosus*), rechtsseitiger (rechtslateraler/rechtsmedialer) oder zentraler iPSS (Broome et al., 2004; Szatmári und Rothuizen, 2006; Haers et al., 2007a; Berent und Weisse, 2010).

Anhand der Shuntmündung werden ePSS unterteilt in portocavale, Portoazygos-, Portophrenico-, Portokolon- und portorenale Shunts sowie Shunts mit Verbindung zu beispielsweise Thorax- oder Lebervenen (Szatmári und Rothuizen, 2006; Haers et al., 2007a; Stosic, 2011). Durch Angabe des Ursprungsgefäßes erfolgt eine weitere Spezifizierung. Häufig sind beim Hund splenocavale Shunts, die die Milzvene über die linke Magenvene mit der hinteren Hohlvene verbinden (auch: linker Magenvenenshunt), Shunts ausgehend von der rechten Magenvene beziehungsweise Gastroduodenalvene zur hinteren Hohlvene (auch: rechter Magenvenenshunt) sowie Portoazygosshunts (in der Regel ausgehend von der Milzvene) (d'Anjou, 2007; Haers et al., 2007a; Stosic, 2011).

3.4 Krankheitsbild

Unter physiologischen Bedingungen wird die Leberperfusion von zwei zuführenden Gefäßsystemen, dem arteriellen System in Form der *Arteria hepatica*, und dem venösen System in Form der *Vena portae*, gewährleistet. Hierbei übernimmt die Pfortader ungefähr 60 bis 80 % der Blutversorgung und 50 % der Sauerstoffversorgung der Leber (Center und Magne, 1990; Berent und Weisse, 2010). Da sie der Leber Blut aus dem Gastrointestinaltrakt mit zahlreichen Nährstoffen zuführt, besitzt sie eine zentrale nutritive Funktion (Paepe et al., 2007a). Hepatotrophe, teilweise pankreatische Hormone wie Insulin, Insulin-like Growth Factor oder Hepatocyte Growth Factor (Hämatopoietin A) erreichen die Leber ebenfalls größtenteils über die Pfortader. Sie sind entscheidend für die physiologische Entwicklung und Aufrechterhaltung von Lebergröße und -funktion (Starzl et al., 1973; Starzl et al., 1976; Mathie et al., 1979; Francavilla et al., 1991; Watson und Herrtage, 1998; Paepe et al., 2007a).

Bei Vorliegen eines PSS kommt es in Folge des mangelnden portalen Blutflusses zu einer Leberhypoplasie und -atrophie (Francavilla et al., 1991). Durch die Shuntverbindung entgehen außerdem toxische Stoffe der Metabolisierung in der Leber, sodass es zum Vollbild einer Leberfunktionsstörung kommt (Paepe et al., 2007a).

Die nachfolgend beschriebenen Symptome sind Ausdruck dieser Leberfunktionsstörung. Sie sind somit nicht spezifisch für einen PSS und weitestgehend für Leberinsuffizienzen unterschiedlicher Genese (Kapitel 2) gültig.

3.4.1 Allgemeine Symptome

Ein cPSS kann bei Hunden jeder Rasse und Größe auftreten, auch wenn einige Rassen wie vorgängig beschrieben (Kapitel 3.2) erhöhte Prävalenzen aufweisen.

Betroffene Hunde werden meist innerhalb des ersten Lebensjahres vorgestellt (van den Ingh et al., 1995). Das mediane Alter variiert je nach Studie und Shuntform zwischen 7 und 8,5 Monaten (Johnson et al., 1987; Watson und Herrtage, 1998; Winkler et al., 2003; d'Anjou et al., 2004; Kummeling et al., 2006; Adam et al., 2012). Bei Hunden mit cPSS ausgehend von der rechten Magenvene wird das mediane Alter mit 20 Monaten angegeben (White und Parry, 2015).

Typischerweise fallen eine Wachstumsretardierung und eine verminderte Körperkondition auf (Center und Magne, 1990; van den Ingh et al., 1995; Paepe et al., 2007a). Watson und Herrtage (1998) klassifizierten in einer retrospektiven Studie 16 von 27 Hunden (76 %) als untergewichtig, Winkler et al. (2003) sprachen bei 7 der 64 untersuchten Hunde (11 %) von einem Gewichtsverlust. Grevel et al. (1987a) stellten bei 50 % der Hunde einen Gewichtsverlust oder ein verzögertes Wachstum fest. Einige der Hunde wiesen zusätzlich Fellveränderungen auf.

Auffällig ist der hoher Anteil an Kryptorchiden: Bei der Hälfte (Johnson et al., 1987) bzw. 36 % (Watson und Herrtage, 1998) der Rüden mit cPSS liegt gleichzeitig ein Kryptorchismus vor.

In Einzelfällen werden die Hunde aufgrund von intermittierendem Fieber vorgestellt, teilweise als einziges Symptom eines PSS (Grevel et al., 1987a; Watson und Herrtage, 1998). Als Ursache gelten transiente Bakteriämien in Folge einer Translokation von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt, die physiologischerweise in der Leber vom retikuloendothelialen System eliminiert werden. Daneben ist die allgemeine Immunkompetenz bei leberinsuffizienten Patienten beeinträchtigt (Watson und Herrtage, 1998; Paepe et al., 2007a).

3.4.2 Hepatoenzephalisches Syndrom

Gemäß des Consensus Statements des Weltkongresses für Gastroenterologie 1998 beschreibt das Hepatoenzephalische Syndrom (HES) das Auftreten neuropsychiatrischer Symptome bei Patienten mit Leberfunktionsstörung nach Ausschluss von anderen Hirnerkrankungen (Ferenci et al., 2002). Das HES entsteht durch Akkumulation neurotoxischer Stoffwechselprodukte, die der Metabolisierung in der Leber aufgrund eines PSS oder einer Leberparenchymerkrankung – mit oder ohne portale Hypertension und erworbene Shuntverbindungen – entgehen. Der cPSS stellt die häufigste Ursache eines HES bei Hund und Katze dar (Broome et al., 2004; Lidbury et al., 2015).

Neurologische Symptome treten bei 47 bis 84 % der betroffenen Hunde auf (Winkler et al., 2003; Mehl et al., 2005; Stosic, 2011; Kilpatrick et al., 2014; Caporali, et al., 2015). In den meisten Fällen sind sie episodisch und progressiv (van den Ingh et al., 1995; Watson und Herrtage, 1998; Paepe et al., 2007a).

Beim Hund werden Lethargie, Desorientierung, Ataxie, Drangwandern, Kopfpresen, Blindheit, Hypersalivation, Aggressivität, Übererregbarkeit, hepatisches Koma oder Krämpfe beobachtet (Grevel et al., 1987a; Johnson et al., 1987; Center und Magne, 1990; van den Ingh et al., 1995; Winkler et al., 2003; Lidbury et al., 2015). Betroffene Hunde neigen außerdem zu Allotriophagie (Aufnahme von ungenießbaren oder als Futter ungeeigneten Stoffen), sodass bei Auftreten von Vomit ein besonderes Augenmerk auf die Abklärung eines gastrischen oder intestinalen Fremdkörpers mit sekundärem Ileus gelegt werden sollte (Grevel et al., 1987a).

Verschiedene Pathomechanismen zur Entstehung des HES werden diskutiert, wobei die jeweilige Bedeutung bisher nicht abschließend geklärt ist (Taboada und Dimski, 1995; Jones und Mullen, 2012).

Ammoniak (NH_3) gilt nach wie vor als wichtiges Neurotoxin (Jones und Mullen, 2012). Er liegt, abhängig vom pH-Wert, in zwei Formen vor: als gasförmiges NH_3 , das frei im Körper diffundieren kann, oder als geladene Base NH_4^+ , die aktiv über Zellmembranen transportiert werden muss (Häussinger, 2007). NH_3 wird überwiegend im Kolon, aber auch im Dünndarm von der intestinalen Flora im Zuge der Zersetzung stickstoffhaltiger Substanzen, beispielsweise Nahrungsproteinen, freigesetzt. Geringere Mengen entstehen während kataboler Stoffwechselvorgänge in anderen Organen wie Nieren, Muskeln oder Gehirn (Center und Magne, 1990). Über die Pfortader wird der anfallende NH_3 der Metabolisierung in der Leber zugeführt. Die Ammoniakkonzentration im portalen Blutkreislauf ist somit physiologisch mehr als zehnfach höher als in der restlichen Zirkulation (Gerritzen-Bruning et al., 2006; Häussinger, 2007). In der Leber werden 80 bis 90 % des NH_3 im Harnstoffzyklus zu Harnstoff abgebaut, der anschließend aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit über die Nieren ausgeschieden werden kann (Center und

Magne, 1990). Ein kleinerer Anteil wird von der Glutaminsynthetase in Hepatozyten und anderen Organen mit Glutamat zu Glutamin umgesetzt. Bei beeinträchtigter Leberfunktion übernimmt beispielsweise die Glutaminsynthetase in der Muskulatur einen Teil des Ammoniakabbaus (Walker et al., 2001; Häussinger, 2007).

Im Falle einer Leberfunktionsstörung mit Hyperammonämie wird auch in den Astrozyten des zentralen Nervensystems vermehrt Glutamin synthetisiert. Dieses akkumuliert intrazellulär und bedingt eine osmotische Schwellung. Folge ist eine Degeneration der Astrozyten und ein Hirnödem (Häussinger, 2007; Ruland, 2009; Jones und Mullen, 2012; Tivers et al., 2014). Desweiteren führt die resultierende extrazelluläre Akkumulation von Glutamat, einem exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, zu einer Downregulation der Glutamat-Rezeptoren. Dies trägt vermutlich zur zentralen Dämpfung im Rahmen des HES bei (Jones und Mullen, 2012).

Verschiedene Studien legen nahe, dass erhöhte Serumgallensäurenkonzentrationen und Hyperammonämie die Permeabilität der Bluthirnschranke für Neurotoxine erhöhen beziehungsweise die Ansprechbarkeit von Rezeptoren modifizieren. Auf diese Weise können sie neurologische Symptome verstärken (Center et al., 1985b; Paepe et al., 2007a; Jones und Mullen, 2012).

Untersuchungen an Hunden mit cPSS identifizierten Hyperammonämie als signifikanten Indikator für das Vorliegen eines HES (Tivers et al., 2014) und wiesen eine positive Korrelation zwischen Ammoniakkonzentration im Blut und Schwere des HES nach (Rothuizen und van den Ingh, 1982a). Eine neuere Untersuchung konnte hingegen keine signifikante Korrelation zwischen Ammoniakkonzentration im Blut und Schwere des HES feststellen. Dennoch lag bei den meisten Hunden mit HES gleichzeitig eine Hyperammonämie vor (Lidbury et al., 2015). Auch andere Daten belegen, dass Hyperammonämie nicht zwingend zur Entstehung eines HES führt (Zandvliet und Rothuizen, 2007). Umgekehrt kann ein HES auch ohne gleichzeitige Hyperammonämie auftreten (Tivers et al., 2014).

Neben NH_3 sind weitere Neurotoxine, deren Metabolisierung in Folge der Leberdysfunktion beeinträchtigt ist, an der Pathophysiologie des HES beteiligt. Die Blutkonzentration endogener Benzodiazepine, auch natürliche Benzodiazepine genannt, ist bei Hunden mit cPSS und HES erhöht im Vergleich zu gesunden Hunden (Aronson et al., 1997). Ihre Herkunft ist nicht sicher geklärt, aber eine Produktion von Benzodiazepinvorstufen durch die intestinale Flora und das Vorhandensein geringer Konzentrationen in der Nahrung scheinen mitverantwortlich zu sein (Aronson et al., 1997; Jones und Mullen, 2012). Ebenfalls spielen vermutlich erhöhte Blutkonzentrationen an aromatischen Aminosäuren, Mercaptanen, kurzkettigen Fettsäuren und Phenolen eine

Rolle (Grevel et al., 1987a; Taboada und Dimski, 1995; Paepe et al., 2007a; Ruland, 2009; Jones und Mullen, 2012).

Daneben sind verschiedene prädisponierende Faktoren in der Diskussion. In der Humanmedizin ist bekannt, dass Hypokaliämie oder Alkalose die Ammoniakkonzentration im Blut erhöhen und Inflamationsreaktionen, Azotämie oder Magendarmblutungen ein HES begünstigen (Taboada und Dimski, 1995; Tivers et al., 2014). In der Veterinärmedizin sind dahingehend noch viele Zusammenhänge unklar. In einer Studie lagen bei 36 von 118 Hunden (31 %) mit HES mögliche Risikofaktoren wie Hypoglykämie, Hypokaliämie oder schwere Entzündungsreaktionen (SIRS = Systemic Innflammatory Response Syndrome) vor. Der Nachweis einer signifikanten Korrelation mit dem Auftreten eines HES gelang jedoch nicht (Lidbury et al., 2015). Andere Untersuchungen bestätigten eine signifikante Assoziation des HES zu einer erhöhten Serumkonzentration an C-reaktivem Protein als Entzündungsmarker und akute-Phase-Protein (Gow et al., 2012), zu einer erhöhten Interleukin 6 (IL-6)-Plasmakonzentration als proinflammatorischem Zytokin (Kilpatrick et al., 2014) und zur Schwere des SIRS (Tivers et al., 2014).

3.4.3 Gastrointestinale Symptome

Gastrointestinale Symptome wie Inappetenz, Anorexie, Vomitus oder Diarrhoe treten regelmäßig auf, sind jedoch unspezifisch (Grevel et al., 1987a; van den Ingh et al., 1995; Mehl et al., 2005; Paepe et al., 2007a; Caporali, et al., 2015; van Straten et al., 2015). Das Vorliegen von Diarrhoe beziehungsweise Vomitus wird variabel mit 20 bis 32 % (Mehl et al., 2005; Adam et al., 2012) beziehungsweise fünf bis 70 % (Johnson et al., 1987; Winkler et al., 2003; Mehl et al., 2005) angegeben. In seltenen Fällen wird Meläna als Anzeichen schwerwiegender gastrointestinaler Blutungen beschrieben (Mehl et al., 2005; Adam et al., 2012). Beim Hund stellen Lebererkrankungen neben der Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika die häufigste Ursache für gastrointestinale Ulzerationen, typischerweise im Duodenum, dar (Stanton und Bright, 1989).

Verschiedene Faktoren sind an der Entstehung gastrointestinaler Symptome beteiligt. Eine verminderte Gallesekretion bedingt eine Maldigestion und in der Folge eine osmotische Diarrhoe (Broome et al., 2004). Vomitus kann auch Zeichen einer Hepatoenzephalopathie (Kapitel 3.4.2) sein (Broome et al., 2004).

3.4.4 Urologische Symptome

Polyurie und Polydipsie sind typische Symptome eines PSS beim Hund. Die Häufigkeit schwankt je nach Studie stark von 7 bis 48 % (Grevel et al., 1987a; Center und Magne, 1990; Tisdall et al., 1994; Mehl et al., 2005; Stosic, 2011). Die Ursachen sind vielfältig. In vielen Fällen liegt zumindest teilweise eine psychogene Polydipsie im Rahmen eines HES zu Grunde (Center und Magne, 1990; Broome et al., 2004). Mitverantwortlich

gemacht werden weiterhin ein verminderter Konzentrationsgradient im Nierenmark – aufgrund erniedrigter Harnstoffkonzentrationen im Blut – sowie eine erhöhte endogene Serumkortisolkonzentration mit Induktion eines sekundär renalen Diabetes insipidus – aufgrund verminderter hepatischer Clearance oder vermehrter Ausschüttung von Corticotropin (ACTH) im Rahmen des HES (Center und Magne, 1990; Meyer und Rothuizen, 1994; Taboada und Dimski, 1995). Polyurie wiederum führt zu einer Auswaschung des Konzentrationsgradientes und zu Elektrolytverschiebungen, die das Ansprechen auf Antidiuretisches Hormon (ADH) vermindern und so die Symptomatik verstärken (Center und Magne, 1990).

Aufgrund der Hyperammonämie neigen betroffene Tiere außerdem zur Bildung von Ammoniumuratsteinen. NH_3 diffundiert passiv in den Urin und wird im sauren Milieu zu NH_4^+ . Gemeinsam mit Harnsäure, die aufgrund der Leberfunktionsstörung nur unzureichend von der hepatischen Urikase in das besser lösliche Allantoin umgewandelt werden kann, fällt NH_4^+ schließlich in Form von Ammoniumurat oder Ammoniumbiurat aus (Center und Magne, 1990; Center, 1996). Bei 40 bis 74 % der Hunde mit cPSS liegt eine Ammoniumbiuratkristallurie vor (Center und Magne, 1990). Der prozentuale Anteil an Hunden mit cPSS und Urolithiasis variiert je nach Studie sehr stark: 20 % (Johnson et al., 1987; Center und Magne, 1990; d'Anjou et al., 2004), 30 % (Winkler et al., 2003), mehr als 50 % (Center und Magne, 1990) und 70 % (d'Anjou et al., 2004). Ammoniumuratsteine können sowohl im Nierenbecken als auch in den Ureteren oder der Blase nachweisbar sein (Center und Magne, 1990; Caporali, et al., 2015). Dabei handelte es sich bei 16 von 17 untersuchten Urolithen zumindest zu einem Anteil um Ammoniumuratsteine (Caporali, et al., 2015). Hämaturie, Dysurie, Strangurie und Harnwegsinfektionen sind häufige Komplikationen der Kristallurie und Urolithiasis (Johnson et al., 1987; Tisdall et al., 1994; van den Ingh et al., 1995; Mehl et al., 2005; Berent und Weisse, 2007). Das Risiko einer Urolithiasis steigt bei männlichen Hunden und mit zunehmendem Alter (Caporali, et al., 2015).

3.5 Diagnostik

3.5.1 Labordiagnostik

Mittels Labordiagnostik ist keine Unterscheidung zwischen cPSS und anderen Leberfunktionsstörungen möglich (Paepe et al., 2007b; Neumann, 2010). Die einzelnen diagnostischen Tests werden in Kapitel 4 besprochen. Zur ätiologischen Differenzierung sind bildgebende Verfahren notwendig.

3.5.2 Bildgebende Verfahren

Als kostengünstiges und nichtinvasives Verfahren steht die Sonographie, insbesondere die Dopplersonographie, zur Verfügung. Hier können einerseits indirekte Hinweise auf das Vorliegen eines cPSS wie Mikrohepatie, verminderte Portalgefäßzeichnung,

Urolithiasis, Mineralisationen der Nieren oder eine Renomegalie gefunden werden (d'Anjou et al., 2004). Der positiv prädiktive Wert von gleichzeitig vorliegender Mikrohepatie, Urolithiasis und Renomegalie in einer Population von Hunden mit Verdacht auf einen cPSS wird mit 100 % angegeben. Allerdings wiesen nur ungefähr ein Drittel der Hunde mit cPSS schließlich auch diese Kombination auf (d'Anjou et al., 2004). Mittels dopplersonographischer Untersuchung des Abdomens lässt sich in fast allen Fällen die Diagnose eines cPSS bestätigen und die Shuntmorphologie näher klassifizieren. Die Sensitivität beziehungsweise Spezifität der sonographischen Untersuchung liegt bei 81 bis 95 % beziehungsweise bei 92 bis 98 % (Lamb, 1996; Winkler et al., 2003; d'Anjou et al., 2004). Die Anschallungsebenen und –techniken sind vielfach beschrieben (Lamb, 1996; d'Anjou et al., 2004; Szatmári und Rothuizen, 2006; Haers et al., 2007b).

Daneben stehen mit Portographie, Szintigraphie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Laparotomie weitere Möglichkeiten zur Visualisierung des Shuntgefäßes zur Verfügung (Kleiter et al., 1999; Broome et al., 2004; Haers et al., 2007a). Die Portographie gilt gemeinhin als Goldstandard (Haers et al., 2007a). Sie kann beispielsweise als intraoperative mesenteriale Portographie oder als transabdominale Splenoportographie durchgeführt werden (Suter, 1975). Die Szintigraphie kann ebenfalls zur Detektion eines PSS angewendet werden. Eine genaue Unterscheidung hinsichtlich der Shuntmorphologie ist jedoch nicht möglich (Broome et al., 2004; Haers et al., 2007b).

Die Röntgenuntersuchung des Abdomens spielt in der Diagnostik des PSS nur eine untergeordnete Rolle. Sie kann gegebenenfalls Hinweise wie eine Mikrohepatie oder eine Renomegalie liefern (Haers et al., 2007a).

3.6 Konservative Therapie

Die konservative Therapie des PSS fußt auf zwei Säulen: der diätetischen und der medikamentellen Therapie. In der Regel stabilisieren oder verbessern sich Körperkondition und Lebensqualität unter der Therapie (Watson und Herrtage, 1998). Die konservative Therapie zielt insbesondere auf eine Linderung der neurologischen Symptomatik ab und findet bei Patienten mit kongenitalem und erworbenem PSS Anwendung (Proot et al., 2009; Lidbury et al., 2015). Sie kann und sollte daher auch vor einem geplanten Verschluss des Shuntgefäßes eingesetzt werden (Proot et al., 2009). Je älter ein Hund zum Zeitpunkt des initialen Auftretens klinischer Symptome ist, desto länger ist tendentiell die Überlebensdauer unter ausschließlicher konservativer Therapie (Watson und Herrtage, 1998).

3.6.1 Diätetische Therapie

Ziel der diätetischen Therapie ist einerseits eine Reduktion neurotoxischer Metabolite (Ammoniak, aromatische Aminosäure, Mercaptane; Kapitel 3.4.2) und andererseits die Aufrechterhaltung einer positiven Stickstoffbilanz im Organismus (Center, 1998; Broome

et al., 2004). Eine proteinreduzierte Diät – sowohl auf Basis pflanzlicher als auch tierischer Proteinquellen – wirkt einem HES erfolgreich entgegen und verbessert vermutlich auch die Leberfunktion (Proot et al., 2009). Besonderes Augenmerk ist auf eine optimale Versorgung mit leichtverdaulichen, hochwertigen Proteinen und essentiellen Aminosäuren zu legen (Broome et al., 2004). Grundsätzlich ist dabei Pflanzen- und Milchproteinen der Vorzug vor Proteinen auf Fleisch-, Fisch- oder Eibasis zu gegeben, da sie einen geringeren Gehalt an aromatischen Aminosäuren zugunsten von verzweigtkettigen Aminosäuren besitzen (Grevel et al., 1987b; Center, 1998; Watson und Herrtage, 1998; Berent und Weisse, 2007; Proot et al., 2009). Milcheiweiße, beispielsweise Hüttenkäse, werden außerdem zügig im Dünndarm resorbiert und in geringerem Ausmaß von der intestinalen Flora zu Ammoniak umgesetzt (Grevel et al., 1987b; Taboada und Dimski, 1995). Die Proteinmenge sollte erst im zweiten Schritt soweit wie notwendig restringiert werden. Damit wird eine katabole Stoffwechsellage vermieden, zumal der Skelettmuskulatur eine wichtige Rolle im Ammoniakmetabolismus zukommt (Grevel et al., 1987b; Center, 1998; Watson und Herrtage, 1998). Verschiedene kommerzielle Leberdiäten mit entsprechender Zusammensetzung sind erhältlich und gut geeignet (Broome et al., 2004). Auf die Verwendung von Nierendiäten, wie sie früher häufig empfohlen wurden, sollte nach diesen Erkenntnissen verzichtet werden, da sie leberinsuffiziente Patienten unzureichend mit Aminosäuren versorgen (Center, 1998; Proot et al., 2009).

Ein hoher Gehalt an löslichen Fasern ist förderlich, da diese im Rahmen der bakteriellen Fermentation zur Ansäuerung des pH-Wertes im Darmlumen und somit zu einer geringeren Ammoniakdiffusion über die Darmwand führen (Proot et al., 2009).

3.6.2 Medikamentöse Therapie

Laktulose ist ein synthetisch hergestelltes Disaccharid, das im Gastrointestinaltrakt weder metabolisiert noch resorbiert wird (Taboada und Dimski, 1995). Die Bakterienflora des Kolons hydrolysiert Laktulose, sodass der Darminhalt angesäuert wird. So wird molekularer NH_3 in ionisiertes NH_4^+ überführt, welches nicht mehr resorbiert werden kann (Grevel et al., 1987b). Daneben besitzt Laktulose eine abführende Wirkung. Aufgrund der verkürzten Magendarmpassagezeit können somit NH_3 und andere toxische Metabolite in geringerem Umfang produziert werden (Grevel et al., 1987b; Taboada und Dimski, 1995; Berent und Weisse, 2007). Laktulose wird in einer initialen Dosis von 0,5-1 ml/kg KG peroral zwei- bis dreimal täglich empfohlen. Im Verlauf sollte die Menge an eine weiche Kotkonsistenz angepasst werden (Taboada und Dimski, 1995; Berent und Weisse, 2007).

Aufgrund des hohen Risikos von Ulzerationen des Magendarmtraktes werden Gastroprotektiva wie der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol (0,5-1 mg/kg KG peroral

ein- bis zweimal täglich) oder der H₂-Rezeptorantagonist Famotidin (0,5-1 mg/kg KG peroral ein- bis zweimal täglich) eingesetzt (Berent und Weisse, 2007).

Zur Reduktion der intestinalen Ammoniakproduktion durch Urease-bildende Bakterien können zusätzlich Antibiotika verabreicht werden. Als gut wirksam sind vor allem Metronidazol, Ampicillin, Amoxicillin und Neomycin beschrieben (Broome et al., 2004; Berent und Weisse, 2007). Aufgrund der Zunahme multiresistenter Bakterien sollte ein Antibiotikum nur bei unzureichendem Ansprechen auf die zuvor genannte Therapie eingesetzt und Wirkstoffen mit geringer enteraler Resorption und lokaler Wirkung im Magendarmtrakt wie Neomycin der Vorzug gegeben werden (Weese et al., 2015).

Je nach Schwere der initialen Symptomatik sind weitere therapeutische Schritte wie Einläufe, Infusionstherapie oder Glukosesubstitution notwendig (Berent und Weisse, 2007). Auf den Einsatz von Methionin als Leberschutzpräparat sollte bei Risiko eines HES verzichtet werden, da dieses von der intestinalen Flora und den Hepatozyten zu Mercaptanen, also neurotoxischen Metaboliten, umgewandelt wird (Grevel et al., 1987b; Center, 1998).

3.7 Verschluss des PSS

Es existieren verschiedene Verfahren zum interventionellen oder chirurgischen Verschluss von iPSS und ePSS. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass ein chirurgischer Verschluss im Vergleich zur konservativen Therapie zu einer signifikanten Verbesserung von Überlebenszeit und klinischer Symptomatik führt (Greenhalgh et al., 2014). In den meisten Fällen ist aufgrund des Risikos einer lebensbedrohlichen portalen Hypertension kein sofortiger vollständiger Verschluss des Shuntgefäßes möglich. Messungen des portalen Druckes dienen als Entscheidungshilfe (Swalec und Smeak, 1990; Hunt und Hughes, 1999; Winkler et al., 2003).

Im Folgenden werden die beiden chirurgischen Verfahren, die in der vorliegenden Studie Anwendung fanden, kurz vorgestellt.

3.7.1 Cellophan Banding

Bei diesem Verfahren wird nach Laparotomie Cellophan um das Shuntgefäß gelegt. Dieses führt im Rahmen einer perivaskulären Entzündungsreaktion, vergleichbar einer Fremdkörperreaktion, zur progressiven Einengung des Shuntgefäßes. Ziel ist ein vollständigen Shuntverschlusses mit geringem Risiko einer portalen Hypertension, da sich die Portalgefäße im Zuge des langsamen Druckanstieges ausbilden können. Auch bei unvollständigem Shuntverschluss konnte in den meisten Fällen eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik erzielt werden (Harari et al., 1990; Youmans und Hunt, 1998; Hunt et al., 2004; Frankel et al., 2006).

3.7.2 Seidenligatur

Bei einem Teil der Hunde mit PSS erlauben Druckmessungen und verschiedene weitere Kriterien nach manueller Okklusion des Shuntgefäßes ein vollständiges Ligieren. Traditionell wird hierfür Seide, ein kaum resorbierbares Nahtmaterial, verwendet (Hunt und Hughes, 1999; Hurn und Edwards, 2003; Broome et al., 2004; Vermote et al., 2007).

Die partielle Okklusion des Shuntgefäßes mit Seide wurde mittlerweile größtenteils durch andere Verfahren zum progressivem Shuntverschluss, wie beispielsweise das Cellophan Banding, ersetzt (Sereda und Adin, 2005).

4 Leberfunktionsdiagnostik beim Hund

Aufgrund der hohen Reservekapazität der Leber führt erst eine fortgeschrittene Leberparenchymschädigung oder aber die Umgehung des Leberparenchyms im Rahmen eines PSS zu einer labordiagnostisch sichtbaren hepatischen Dysfunktion (Neumann, 2013a). Sie ist Ausdruck einer Einschränkung sowohl der synthetischen als auch der metabolischen Funktion der Leber. Im Falle chronischer Hepatopathien mit Fibrose und Zirrhose kommt es außerdem zu einer sekundären intrahepatischen Cholestase, die bei einem PSS nicht gesehen wird (Neumann, 2013a).

Es existieren viele etablierte labordiagnostische Parameter, überwiegend in Form von Blutuntersuchungen, die zur Evaluierung der Leberfunktion herangezogen werden können. Erste Hinweise auf eine Leberdysfunktion ergeben sich bereits im Rahmen der Routinediagnostik mit hämatologischer, blutchemischer und Urinuntersuchung. Weiterführend stehen spezifische Leberfunktionsmarker wie die Bestimmung der Serumgallensäurenkonzentration oder der Blutammoniakkonzentration zur Verfügung. Man unterscheidet prinzipiell zwischen Syntheseparametern, Cholestasemarkern, Exkretionsparametern sowie Indikatoren der Leberzellintegrität, wobei letztere nicht zu den klassischen Leberfunktionsparametern zählen (Neumann, 2013a).

Grundsätzlich finden die einzelnen Parameter, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, im Rahmen unterschiedlicher Hepatopathien Anwendung. Sie sind nicht spezifisch für eine Erkrankung, sondern lediglich Ausdruck einer Leberfunktionsstörung. Die ätiopathogenetische Diagnose bleibt anderen Verfahren vorbehalten. Einschränkung sei jedoch vorangestellt, dass ein Großteil der labordiagnostischen Verfahren anhand des PSS als Modellerkrankung einer Leberfunktionsstörung etabliert wurde, ebenso wie sich auch die vorliegende Arbeit dieser Erkrankung bedient. Bezüglich anderer Leberdysfunktionen besteht für den Hund nur eine vergleichsweise geringe Evidenz.

4.1 Hämatologische Parameter

Typisch für Leberfunktionsstörungen unterschiedlicher Ätiologie ist das Vorliegen einer mikrozytären Anämie (Center und Magne, 1990; Rutgers et al., 1993; Laflamme et al., 1994; Mwanza et al., 1997; Elhiblu et al., 2015).

Beim PSS und anderen PSVA steht die Mikrozytose im Vordergrund, die von einer normo- oder hypochromen Anämie begleitet werden kann (Johnson et al., 1987; Bunch et al., 1995; Simpson et al., 1997; Paepe et al., 2007b). Ein vermindertes mittleres Erythrozytenvolumen (MCV) ist bei 48 bis 100 % der betroffenen Hunde nachweisbar (Johnson et al., 1987; Center und Magne, 1990; Laflamme et al., 1994; Meyer und Harvey, 1994; Bunch et al., 1995; Simpson et al., 1997; Niles et al., 2001; Adam et al.,

2012). In der Regel handelt es sich um eine nichtregenerative Anämie (Johnson et al., 1987; Center und Magne, 1990). In mehreren Studien wird eine Zunahme der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) beobachtet, die vermutlich auf den gesteigerten Anteil an mikrozytären Erythrozyten zurückzuführen ist (Laflamme et al., 1994; Bunch et al., 1995).

Auch wenn die Pathogenese der mikrozytären Anämie bislang nicht abschließend geklärt ist, scheint die Ursache nicht, wie lange vermutet, eine Eisenmangelanämie im Sinne eines absoluten Eisenmangels zu sein. Es handelt sich vielmehr um einen funktionellen Eisenmangel, der mit einer Umverteilung (Eisensequestration), einer erschwerten Verwendung der Eisenspeicher sowie einem beeinträchtigten Eisentransport zusammenhängt (Laflamme et al., 1994; Meyer und Harvey, 1994; Bunch et al., 1995; Simpson et al., 1997). Es bestehen Parallelen zur Anämie der chronischen Entzündung, jedoch konnten auch Unterschiede, beispielsweise bezüglich der Serumeisenbindungskapazität, aufgezeigt werden (Laflamme et al., 1994; Meyer und Harvey, 1994).

Der Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHr) ist als verlässlicher und früher Indikator einer Eisenmangelanämie, aber auch anderer funktioneller Eisenmangelzustände etabliert (Steinberg und Olver, 2005; Schaefer und Stokol, 2015). Nahezu alle Hunde mit PSS zeigten einer Studie zufolge einen erniedrigten CHr (Schaefer und Stokol, 2015).

Neben Abweichungen der Erythrozytenindizes fallen regelmäßig Sonderformen von Erythrozyten auf. Center und Magne (1990) beschreiben bei ungefähr der Hälfte der Hunde mit cPSS ein erhöhtes Vorkommen an Target-Zellen (Schießscheibenzellen). Sie sind auf eine veränderte Zusammensetzung der Erythrozytenmembran im Rahmen des beeinträchtigten Fettstoffwechsels (beispielsweise eine verminderte Cholesterinsynthese) zurückzuführen (Francavilla et al., 1980; Center und Magne, 1990; Simpson et al., 1997).

4.2 Blutchemische Parameter

4.2.1 Albumin

Albumin erfüllt vielfältige Aufgaben im Organismus. Aufgrund diverser Bindungsstellen sowie seiner Fähigkeit zur Konformationsänderung und damit zur Anpassung seiner dreidimensionalen Struktur dient Albumin als wichtigstes unspezifisches Transportprotein. Als Liganden kommen unter anderem Fettsäuren, unkonjugiertes Bilirubin, Kupfer, hydrophobe Gallensäuren, Schilddrüsenhormone und unterschiedliche Medikamente und Toxine in Frage (Weisiger, 2007). Des Weiteren ist Albumin zu ungefähr 80 % an der Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes im Gefäßsystem beteiligt (Weisiger, 2007).

Da Albumin ausschließlich in der Leber synthetisiert wird, zählt es zu den klassischen Syntheseparametern (Center und Magne, 1990; Weisiger, 2007; Neumann, 2010). Seine

Halbwertszeit wird mit sieben bis 21 Tagen angegeben (Richter, 2003). Aufgrund der großen Bedeutung für den Organismus wird die Albuminsynthese von der Leber möglichst lange im Krankheitsverlauf gewährleistet, sodass eine Hypoalbuminämie Anzeichen einer chronischen und schwerwiegenden Leberfunktionsstörung mit einem Leberparenchymverlust von 50 bis 80 % ist (Sevelius, 1995; Richter, 2003; Cooper und Webster, 2006, 2006; Neumann, 2010; Bexfield et al., 2011; Rothuizen, 2012; Fieten et al., 2014; Elhiblu et al., 2015). Für einige Erkrankungen wie die Aflatoxikose oder die primäre Hepatitis des Hundes ist eine Hypoalbuminämie als negativ prognostischer Faktor beschrieben (Dereszynski et al., 2008; Poldervaart et al., 2009; Rothuizen, 2012). Auch bei Hunden mit Sagopalmenintoxikation zeigte sich eine signifikant niedrigere Serumalbuminkonzentration bei den verstorbenen Hunden (Ferguson et al., 2011).

Beim cPSS des Hundes wird die Häufigkeit von Hypoalbuminämien je nach Studie sehr variabel mit 15,5 bis 90 % angegeben (Johnson et al., 1987; Center und Magne, 1990; Simpson et al., 1997; Niles et al., 2001; Adam et al., 2012; Caporali, et al., 2015).

Möglicherweise trägt die Hypoalbuminämie aufgrund der verringerten Bindungskapazität toxischer Metabolite (Bilirubin, langkettige Fettsäuren) oder exogener Medikamente und Toxine zur Entstehung des HES bei (Weisiger, 2007).

Differentialdiagnostisch muss bei erniedrigten Serumalbuminkonzentrationen an eine verminderte Proteinaufnahme infolge von Inappetenz und an Blutungen, die beide im Rahmen von Hepatopathien auftreten können, oder aber an parallel vorliegende Proteinverlustenteropathien oder –nephropathien gedacht werden (Schwendenwein, 2013). Außerdem kann Albumin als negatives Akute-Phase-Protein im Verlauf entzündlicher Erkrankungen wie Hepatitiden erniedrigt sein (Cerón et al., 2005).

4.2.2 Harnstoff

Harnstoff gehört ebenfalls zu den Syntheseprodukten der Leber. Er wird dort unter hohem Energieaufwand im Harnstoffzyklus aus Ammoniumionen, Aspartat und Hydrogenkarbonat gebildet (Neumann, 2013a). Physiologischerweise beträgt die Harnstoffsynthese lediglich 60 % der Gesamtkapazität des Harnstoffzyklus, weshalb eine hohe Reservekapazität besteht (Center und Magne, 1990). Erst bei Verlust von 80 bis 90 % des Leberparenchyms konnte experimentell eine verminderte Desaminierung und Harnstoffsynthese nachgewiesen werden (Goettsch et al., 1942). Zusätzlich kann bei Patienten mit Leberinsuffizienz die begleitende Polyurie und eine restriktive Proteinzufuhr zur Erniedrigung der Serumharnstoffkonzentrationen beitragen (Paepe et al., 2007b).

Sowohl bei Leberparenchymerkrankungen als auch beim PSS tritt regelmäßig eine Erniedrigung der Serumharnstoffkonzentration auf. Bezüglich PSVA beim Hund wird die Häufigkeit mit 48 bis 74 % angegeben (Grevel et al., 1987a; Center und Magne, 1990; Simpson et al., 1997; Niles et al., 2001; Bexfield et al., 2011). Gleichzeitig kann die

Serumharnstoffkonzentration auch erhöht sein bei Dehydratation, gastrointestinalen Blutungen oder eingeschränkter Nierenfunktion (Neumann, 2013a).

Harnstoff stellt wie Albumin einen wenig spezifischen und wenig sensitiven Indikator der Leberfunktion dar. Jedoch sollte bei entsprechend niedrigen Serumkonzentrationen an diese Differentialdiagnose gedacht und gegebenenfalls weiterführende Tests eingeleitet werden (Richter, 2003).

4.2.3 Glukose

Die Leber nimmt als Hauptsitz von Glukoneogenese, Glykogenspeicherung und Glykogenolyse eine zentrale Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel ein und ist über Hormone wie Insulin und Glukagon in die Regulation der Blutglukosekonzentration eingebunden (Center und Magne, 1990; Paepe et al., 2007b). Bis zu einem Leberparenchymverlust von 70 bis 75 % kann eine Euglykämie aufrechterhalten werden, darüber hinaus stellt sich insbesondere nach Nüchternphasen eine Hypoglykämie ein (Richter, 2003; Weingarten und Sande, 2015). Glukose ist somit ein weiterer Syntheseparameter der Leberfunktion.

Hunde mit cPSS oder Leberzirrhose weisen signifikant niedrigere Blutglukosekonzentrationen auf als Kontrollhunde (Collings et al., 2012; Elhiblu et al., 2015). Die Häufigkeit einer Hypoglykämie beim cPSS variiert mit 9,6 bis 40 % sehr stark (Johnson et al., 1987; Tisdall et al., 1994; Holford et al., 2008; Collings et al., 2012; Caporali, et al., 2015). Ein besonderes Risiko besteht hierbei für kleinwüchsige Rassen (Johnson et al., 1987; Tisdall et al., 1994). Bei Hunden mit chronischer Hepatitis gilt eine Hypoglykämie als Indikator eines früheren Versterbens (Richter, 2003). Die neurologischen Symptome, die beim hypoglykämischen Patienten auftreten können, ähneln denen eines HES und können dieses verstärken (Center und Magne, 1990; Berent und Weisse, 2007).

Die Ursache der Hypoglykämie im Rahmen einer Leberinsuffizienz ist nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden eine insuffiziente Glukoneogenese und Glykogenspeicherung wie auch veränderte Blutkonzentrationen an Insulin, Glukagon und Cortisol oder Abweichungen in der Ansprechbarkeit auf diese Hormone (Center und Magne, 1990; Paepe et al., 2007b). Der Nachweis erhöhter endogener Insulin- oder Kortisolkonzentrationen als Ursache der Hypoglykämie beim cPSS gelang bisher nicht (Holford et al., 2008; Collings et al., 2012).

4.2.4 Cholesterin

Cholesterin wird zu ungefähr 50 % in der Leber synthetisiert oder über freie Diffusion enteral resorbiert (Center und Magne, 1990; Neumann, 2013b). Es fungiert als Baustein für Zellmembranen und Ausgangsprodukt für die Synthese von Gallensäuren, Steroidhormonen und Vitamin D3 (Neumann, 2013b).

Eine Leberinsuffizienz führt im Rahmen einer verminderten Syntheseleistung zu einer Hypcholesterinämie (Francavilla et al., 1980). Die Häufigkeit beim cPSS beziehungsweise bei PSVA im Allgemeinen wird mit 20 bis 72 % angegeben (Grevel et al., 1987a; Center und Magne, 1990; Simpson et al., 1997; Niles et al., 2001). Bei der Aflatoxikose des Hundes gilt eine Hypcholesterinämie als früher Biomarker und ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Dereszynski et al., 2008).

Da die Ausscheidung von Cholesterin hauptsächlich über die Galle erfolgt, gehen cholestatische Hepatopathien hingegen häufig mit einer Hypercholesterinämie einher (Neumann, 2013b). Cholesterin ist somit gleichzeitig ein Syntheseparameter und ein Cholestasemarkers.

4.2.5 Bilirubin

Bilirubin ist ein Abbauprodukt aus dem Hämoglobinstoffwechsel. Im mononukleären Phagozytensystem (MPS) wird Hämoglobin über Biliverdin zu unkonjugiertem, lipophilen Bilirubin (Bilirubin I) abgebaut. Dieses wird, an Albumin gebunden, über das Gefäßsystem zur Leber transportiert. Hier wird es von den Hepatozyten zu hydrophilem Bilirubin (Bilirubin II) konjugiert, welches in die Galle sezerniert und so über den Darm ausgeschieden werden kann. Enteral wird Bilirubin zum Großteil zu Sterkobilin reduziert. Ein geringer Anteil gelangt über den enterohepatischen Kreislauf zurück in den Kreislauf (Richter, 2003; Neumann, 2013a).

Bei Vorliegen einer Hyperbilirubinämie oder eines Ikterus erfolgt anhand der jeweiligen Pathogenese eine Klassifizierung in prähepatisch (Hämolyse), hepatisch (Leberparenchymerkrankung) und posthepatisch (Cholestase) (Richter, 2003; Neumann, 2013a). Die Hyperbilirubinämie im Rahmen von Hepatopathien wird einer intrahepatischen Cholestase durch Verlust von Tight Junctions, Nekrose und Hepatozytenschwellung oder einer Fibrose oder Zirrhose zugeschrieben (Richter, 2003; Weingarten und Sande, 2015). Außerdem können infektiöse und nicht-infektiöse Hepatitiden über eine zytokinvermittelte Downregulation der hepatozellulären Transportmechanismen verschiedener Gallebestandteile zu einer entzündungsinduzierten Cholestase führen (Trauner et al., 1999).

Aufgrund der hohen Reservekapazität der Leber, die im gesunden Zustand bis zum 30fachen der physiologischerweise anfallenden Bilirubinmenge ausscheiden kann, tritt eine hepatische Hyperbilirubinämie nur bei schwerwiegenden und diffusen

Hepatopathien auf. Bilirubin stellt somit einen vergleichsweise insensitiven Cholestasemarker dar (Richter, 2003; Weingarten und Sande, 2015). Beim Hund kommt eine Hyperbilirubinämie bei chronischen Hepatitiden oder verschiedenen Vergiftungen wie Aflatoxikose, Xylitolintoxikation oder Sagopalmenintoxikation vor (Mwanza et al., 1997; Dunayer und Gwaltney-Brant, 2006; Shih et al., 2007; Dereszynski et al., 2008; Bexfield et al., 2011; Peterson, 2013; Gomez Selgas et al., 2014; Weingarten und Sande, 2015). In der Humanmedizin ist der Schweregrad der Hyperbilirubinämie als negativ prognostischer Faktor Bestandteil verschiedener Scoringssysteme von Lebererkrankungen (Weingarten und Sande, 2015). Einige Studien identifizierten eine Hyperbilirubinämie als negativ prognostisch bei Hunden mit Sagopalmenintoxikation (Ferguson et al., 2011) oder idiopathischer chronischer Hepatitis (Gomez Selgas et al., 2014). Ein cPSS geht klassischerweise nicht mit einer Hyperbilirubinämie einher (Center und Magne, 1990; Paepe et al., 2007b).

Bei Vorliegen einer Hyperbilirubinämie ist die Bestimmung der Serumgallensäurenkonzentration nicht indiziert, da beide Metabolite ähnliche Transportmechanismen nutzen und somit simultan erhöht sind (Richter, 2003). Eine Unterscheidung zwischen prähepatischen, hepatischen oder posthepatischen Ursachen anhand der Messung von konjugiertem und unkonjugiertem Bilirubin hat sich beim Hund als nicht verlässlich erwiesen (Richter, 2003; Neumann, 2013a).

4.2.6 Leberenzymaktivitäten

Die Leberenzymaktivitäten stellen einen sensitiven Indikator einer beeinträchtigten Leberzellintegrität dar, ihre Aussage bezüglich einer Funktionseinschränkung ist jedoch begrenzt (Alvarez und Whittemore, 2009). Daher zählen sie nicht zu den klassischen Leberfunktionsparametern (Richter, 2003; Neumann, 2010). Ebenso korreliert der Schweregrad der Erhöhung der Leberenzymaktivitäten nicht zwingend mit dem tatsächlichen hepatozellulären Schaden (Fuentealba et al., 1997; Cooper und Webster, 2006; Dereszynski et al., 2008). Beispielsweise können im Rahmen einer Leberzirrhose die Werte innerhalb des Referenzbereiches liegen (Elhiblu et al., 2015).

Unterschieden wird zwischen Enzymen, die primär die Zellintegrität der Hepatozyten widerspiegeln, wie die Alaninaminotransferase (ALT) und die Aspartataminotransferase (AST), und Indikatoren einer Cholestase, wie die Alkalische Phosphatase (AP) und die γ -Glutamyltransferase (GGT) (Boyd, 1988; Alvarez und Whittemore, 2009; Weingarten und Sande, 2015). Hierbei ist insbesondere die AP wenig spezifisch und beispielsweise bei Junghunden in der Wachstumsphase, bei Knochenläsionen oder im Rahmen einer Induktion durch Steroide oder andere Medikamente erhöht (Boyd, 1988; Richter, 2003; Alvarez und Whittemore, 2009).

Insgesamt werden erhöhte Aktivitäten von Leberenzymen bei vielen parenchymatösen und cholestatischen Lebererkrankungen gemessen, zur Interpretation hinsichtlich einer Leberfunktionseinschränkung bedarf es jedoch weiterer Befunde. Beim cPSS als Modellerkrankung einer Leberfunktionsstörung wird lediglich intermittierend eine geringgradige Erhöhung von AP oder ALT gesehen, die vermutlich auf das junge Alter der Hunde oder eine geringgradige hypoxische Schädigung der Hepatozyten zurückzuführen ist (Laflamme et al., 1994; Watson und Herrtage, 1998; Paepe et al., 2007b; Adam et al., 2012).

4.3 Gerinnungsparameter

Zu den Aufgaben der Leber zählt die Synthese fast aller Gerinnungsfaktoren (Faktoren I, II, V, VII, IX, X, XI, XII, XIII), die Produktion fibrinolytischer Faktoren wie Plasminogen und antikoagulatorischer Faktoren wie Antithrombin III, sowie die Clearance dieser Gerinnungsfaktoren (Richter, 2003; Neumann, 2010; Kavanagh et al., 2011). Des Weiteren erfolgt die Resorption von Vitamin K, das essentiell für die Aktivierung einiger Gerinnungsfaktoren ist, abhängig von Gallensäuren. So können gerade biliäre Erkrankungen zu Vitamin K-abhängigen Koagulopathien führen (Neumann, 2010). Die sekundäre Hämostase gilt somit als weiterer Syntheseparameter der Leber.

Typische Befunde, die im Rahmen verschiedener Hepatopathien regelmäßig erhoben werden, umfassen eine verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), eine verlängerte Prothrombinzeit (PT) sowie eine Hypofibrinogenämie (Badylak et al., 1983; Center und Magne, 1990; Niles et al., 2001; Dunayer und Gwaltney-Brant, 2006; Kummeling et al., 2006; Shih et al., 2007; Dereszynski et al., 2008; Prins et al., 2010; Bexfield et al., 2011; Ferguson et al., 2011; Elhiblu et al., 2015). Hierbei korreliert der Schweregrad der Leberfunktionsstörung mit dem der Hämostasestörung und eine klinisch relevante Koagulopathie wird vor allem bei fortgeschrittenen Leberparenchymerkrankungen beobachtet (Niles et al., 2001; Kavanagh et al., 2011; Kelley et al., 2015). Bezüglich der Aflatoxikose und der Sagopalmenintoxikation des Hundes sind verlängerte Gerinnungszeiten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Dereszynski et al., 2008; Ferguson et al., 2011).

In der Humanmedizin wird eine Verlängerung der PT um mehr als das 1,5-fache des oberen Referenzbereiches als Kriterium eines akuten Leberversagens herangezogen (Lee et al., 2012). Unter Bezugnahme auf diese Definition wiesen Hunde mit akutem Leberversagen unterschiedlicher Ätiologie in der Thrombelastografie häufiger eine Hypokoagulabilität und eine Hyperfibrinolyse auf (Kelley et al., 2015). Außerdem können sich bei Hunden mit akutem Leberversagen, seltener auch bei Hunden mit Leberzirrhose, gering- bis mittelgradige Thrombozytopenien finden (Dunayer und Gwaltney-Brant, 2006; Prins et al., 2010; Weingarten und Sande, 2015).

Beim cPSS des Hundes treten zwar häufig eine verlängerte aPTT und eine Hypofibrinogenämie, jedoch kaum klinisch relevante Blutungen auf (Center und Magne, 1990; Niles et al., 2001; Kummeling et al., 2006). Ebenso ist keine relevante Störung der primären Hämostase im Sinne einer Thrombozytopenie oder -pathie nachweisbar (Niles et al., 2001; Kalbantner et al., 2011). Vor allem bei Hunden mit HES liegt in der Thrombelastografie sogar häufiger eine Hyperkoagulabilität vor, möglicherweise vor dem Hintergrund einer Entzündungsreaktion (Kelley et al., 2013).

4.4 Urinuntersuchung

Lebererkrankungen können zu Polyurie und Polydipsie und damit einhergehend zu Iso- oder Hypostenurie führen, beispielsweise im Rahmen eines HES oder durch einen verminderten Konzentrationsgradienten des Nierenmarks in Folge der verminderten Harnstoffsynthese (Lunn und James, 2007). Daneben liegt eine Prädisposition für die Bildung von Ammoniumuratkristallen oder -steinen vor (Center, 1996). Die Befunde und zugrundeliegenden Mechanismen entsprechen denen beim cPSS. Für weiterführende Erläuterungen zu Pathogenese, Befunden der Urinuntersuchung und Vorkommen von Urolithiasis beim cPSS wird daher auf Kapitel 3.4.3 verwiesen.

4.5 Dynamische Leberfunktionstests

Dynamische Leberfunktionstests geben weiteren Aufschluss über die Leberfunktion und können gezielt bei Verdacht oder zum Ausschluss einer Leberdysfunktion durchgeführt werden. Derzeit sind vor allem die Bestimmung der prä- und postprandialen Serumgallensäurenkonzentration sowie die Bestimmung der basalen Ammoniakkonzentration, gegebenenfalls in Verbindung mit einem Ammoniaktoleranztest, gebräuchlich. Diese Tests haben weitestgehend die Indocyaningrün (ICG)- und die Sulfobromophthalein(BSP)-Elimination abgelöst.

4.5.1 Präprandiale Gallensäuren und Gallensäurenstimulationstest (GST)

Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterol synthetisiert und als Hauptbestandteil der Galle ins Gallengangssystem sezerniert. Stimuliert durch Nahrungsaufnahme werden sie nach Kontraktion der Gallenblase ins Darmlumen abgegeben, wo sie maßgeblich an der Fettverdauung und Resorption fettlöslicher Vitamine beteiligt sind. Über den enterohepatischen Kreislauf werden mehr als 95 % der Gallensäuren aus dem Darm rückresorbiert und zügig über den Pfortaderkreislauf wieder der Leber zugeführt (Richter, 2003; Jansen und Faber, 2007; Neumann, 2013a).

Störungen der portalen Zirkulation, eine Reduktion des funktionellen Leberparenchyms oder eine Cholestase (intra- oder posthepatisch) bedingen eine erhöhte Serumgallensäurenkonzentration (Center, 1990; Richter, 2003; Cullen et al., 2006). Deshalb ist bei Vorliegen einer Hyperbilirubinämie die Bestimmung der

Serumgallensäurenkonzentration nicht indiziert (Richter, 2003). Regelmäßig tritt eine erhöhte Serumgallensäurenkonzentration bei PSVA, primären und sekundären Hepatopathien auf (Johnson et al., 1985; Mwanza et al., 1997; Simpson et al., 1997; Niles et al., 2001; Richter, 2003; Bexfield et al., 2011; Adam et al., 2012; Fieten et al., 2014). Es handelt sich somit nicht um einen spezifischen Befund einer bestimmten Leberfunktionsstörung oder eines PSS (Rothuizen, 2012). Bei Störungen der enteralen Resorption, Magenentleerungsstörungen oder verlängerter intestinaler Transitzeit kann es zu falsch niedrigen Werten kommen (Center, 1990; Center, 1996).

Die Bestimmung der Serumgallensäurenkonzentration kann als präprandialer Basalwert oder kombiniert mit einem Gallensäurenstimulationstest (GST) erfolgen. Hierbei wird der präprandiale Wert nach zwölfstündigem Fasten und der postprandiale Wert zwei Stunden nach Fütterung gemessen (Center, 1996). Alternativ kann mit vergleichbaren Resultaten Ceruletid, ein Cholezystokinin-Analagon, zur Auslösung der Gallenblasenkontraktion eingesetzt und ein stimulierter Wert nach 30 Minuten bestimmt werden (Bridger et al., 2008). Ceruletid ist jedoch zurzeit nicht mehr kommerziell erhältlich. Auch eine Bestimmung der Gallensäurenkonzentration im Urin ist beschrieben, hat sich aber wegen vergleichbarer Resultate gegenüber der Blutuntersuchung nicht durchgesetzt (Balkman et al., 2003).

Die Sensitivität der präprandialen Serumgallensäurenkonzentration zur Diagnostik eines PSS beziehungsweise einer PSVA liegt zwischen 92,2 und 100 % (d'Anjou et al., 2004; Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland et al., 2010; van Straten et al., 2015). Durch die Einbeziehung der postprandialen Serumgallensäurenkonzentration kann die Sensitivität weiter verbessert werden (Center et al., 1985b, 1985b; Jensen, 1991; Turgut et al., 1997; Winkler et al., 2003). Die Spezifität der präprandialen Serumgallensäurenkonzentration zur Diagnostik eines PSS beziehungsweise einer PSVA wird mit 58 bis 67,9 % angegeben (Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland et al., 2010; van Straten et al., 2015). Bezieht man sich jedoch auf die Detektion einer hepatobiliären Erkrankung im Allgemeinen, so steigt die Spezifität auf bis zu 100 % an (Center et al., 1985a; Center et al., 1991).

Insgesamt handelt es sich also um einen guten Screeningtest zur Abklärung beziehungsweise zum Ausschluss eines PSS. Gerade aufgrund der Erhöhung im Rahmen einer Cholestase besitzt er zur Diagnose eines PSS aber nur eine begrenzte Spezifität. Es kann vom Grad des Anstiegs kein Rückschluss auf die Ätiologie oder die Schwere der zugrundeliegenden Hepatopathie gezogen werden (Center et al., 1985a; Jensen, 1991; Schlesinger und Rubin, 1993). Bei extrahepatischer Gallengangsobstruktion finden sich allerdings häufig prä- und postprandiale Serumgallensäurenkonzentrationen von über 200 $\mu\text{mol/l}$ (Referenzbereich $<25 \mu\text{mol/l}$) (Center, 1996). Durch Einbeziehung anamnestischer, klinischer und weiterer

labordiagnostischer Befunde (Alter, Ikterus, Leberenzymaktivitäten) kann die Ätiologie näher eingegrenzt werden (Center, 1990). So wurde bei einem PSS-Screening von Irischen Wolfshundwelpen sogar eine Sensitivität und Spezifität von 100 % erzielt (Kerr und van Doorn, 1999).

Von einer auffälligen Häufung falsch positiver Resultate wurde bei 64 % der untersuchten Yorkshire Terrier und bis zu 79 % der Malteser berichtet (Tisdall et al., 1995; Tobias, 2003; O'Leary et al., 2014). Die Ursache ist bisher noch nicht geklärt. Vermutet wurde das Vorliegen einer zusätzlichen Substanz im Serum der Tiere, das die enzymatische spektrophotometrische Messmethode verfälscht (Tisdall et al., 1995).

Aufgrund der einfachen Durchführung, der Probenstabilität und des Verzichts auf die Zuführung exogener Substanzen ist der GST in der veterinärmedizinischen Praxis bei vergleichbarer Sensitivität gebräuchlicher als der Ammoniaktoleranztest, auf den nachfolgend eingegangen wird (Center et al., 1985b; Paepe et al., 2007b).

4.5.2 Basaler Ammoniak und Ammoniaktoleranztest (ATT)

Wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben, erfolgt der Ammoniakabbau hauptsächlich über den Harnstoffzyklus in der Leber. Eine erhöhte Blutammoniakkonzentration kann daher als Indikator einer Leberfunktionsstörung, insbesondere eines PSS, herangezogen werden. Zur Verfügung steht die alleinige Messung des Basalwertes nach zwölfstündigem Fasten oder die Kombination mit einem oralen oder rektalen Ammoniaktoleranztest (ATT). Beim oralen ATT wird nach Bestimmung des Basalwertes Ammoniumchlorid in einer Dosierung von 100 mg/kg bis zu einer maximalen Gesamtdosis von 3 g als Lösung oder als Pulver in Gelatinekapseln oral oder über eine Magensonde eingegeben (Meyer et al., 1978; Center, 1996). Standardmäßig wird 30 Minuten nach Eingabe erneut die Blutammoniakkonzentration bestimmt (Meyer et al., 1978). Bei einigen Hunden mit PSVA besteht ein weiterer Anstieg 60 Minuten nach Eingabe (Center et al., 1985b). Da die orale Eingabe von Ammoniumchlorid ab und an Erbrechen auslöst, kann alternativ ein rektaler ATT durchgeführt werden (Center, 1990). Dabei wird eine halbe Stunde zuvor mittels Einlauf das Rektum des Hundes geleert, dann eine Ammoniumchloridlösung in der oben beschriebenen Dosierung tief rektal über einen Katheter verabreicht und die Blutammoniakkonzentration 20 und 40 Minuten nach Eingabe ermittelt (Rothuizen und van den Ingh, 1982b).

Je nach Messverfahren wird ein Referenzbereich für den präprandialen Basalwert von weniger als 46 bis 59 $\mu\text{mol/l}$ angegeben (Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland et al., 2010; Neumann, 2013a). Physiologischerweise ist im Rahmen des ATT maximal ein leichtgradiger Anstieg der Blutammoniakkonzentration von weniger als 32 % nachweisbar (Richter, 2003). Von einem positiven Test spricht man in der Regel ab einer Erhöhung auf das Zweifache des Ausgangswertes (Center, 1996; Neumann, 2013a). Liegt der

Basalwert bereits über 100 µmol/l, wird ein Toleranztest nicht mehr benötigt (Cullen et al., 2006).

Das Probenhandling und die Durchführung der Ammoniakmessung sind anspruchsvoll. Eine sofortiges Verbringen der Blutproben auf Eis und Abzentrifugieren in gekühlter Umgebung sowie eine Probenanalyse innerhalb von einer Stunde sind unerlässlich. Zu kraftvolles Anstauen der Vene bei der Blutprobenentnahme, Hämolyse und Kontakt zu Schweiß, Speichel oder Zigarettenrauch können zu einem drastischen Anstieg der Messwerte führen (Center, 1996; Gerritzen-Bruning et al., 2006). Mittlerweile sind auch Point-of-Care-Analysegeräte zur erleichterten Ammoniakmessung beim Hund etabliert (Sterczer et al., 1999; Goggs et al., 2008).

Die basale Blutammoniakkonzentration zeigt für den PSS beziehungsweise PSVA eine Sensitivität von 81 bis 100 % (Johnson et al., 1987; Tisdall et al., 1994; Walker et al., 2001; Winkler et al., 2003; d'Anjou et al., 2004; Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland et al., 2010) und eine Spezifität von 86 bis 89 %, auch bei einer Referenzpopulation aus leberkranken Hunden (Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland et al., 2010). Im direkten Vergleich mit der präprandialen Serumgallensäurenkonzentration schnitt die Sensitivität der basalen Blutammoniakkonzentration in zwei Studien besser (Ruland et al., 2010; van Straten et al., 2015) und in einer Studie schlechter (Gerritzen-Bruning et al., 2006) ab, die Spezifität war jeweils besser. Sind beide Basalwerte erhöht, so liegt der positiv prädiktive Wert für das Vorliegen eines PSS bei 97 % (van Straten et al., 2015). Der ATT zeigt für den PSS eine verbesserte Sensitivität von 92 bis 100 % (Center et al., 1985b; Center, 1990; Tisdall et al., 1994; van Straten et al., 2015) und eine Spezifität von 79 % (van Straten et al., 2015). Mit einem negativ prädiktiven Wert von 100 % handelt es sich beim ATT um einen exzellenten Test zum Ausschluss eines PSS (van Straten et al., 2015).

Neben dem ATT ist die Messung einer postprandialen Blutammoniakkonzentration beschrieben. Vorgeschlagen wird eine Blutprobenentnahme sechs Stunden nach Fütterung, womit die Sensitivität zur Detektion eines PSS gegenüber dem basalen Wert von 81 auf 91 % gesteigert werden konnte (Walker et al., 2001). Dieser Test kommt jedoch aufgrund des schlechteren Abschneidens im Vergleich zum ATT kaum zum Einsatz.

Die Ammoniakbestimmung liefert insgesamt ausgezeichnete Resultate hinsichtlich Störungen des Pfortaderkreislaufes, ist jedoch deutlich weniger sensitiv im Hinblick auf hepatozelluläre Erkrankungen. Sie ist nicht von Cholestase beeinflusst (Gerritzen-Bruning et al., 2006; Ruland et al., 2010). Differentialdiagnostisch kommen bei Hyperammonämie neben einem PSS ein hochgradiger Verlust an funktionellem Leberparenchym von mehr als 70 % oder, in seltenen Fällen, angeborene Enzymdefekte des Harnstoffzyklus oder des Cobalaminrezeptors in Frage (Center, 1996; Gerritzen-Bruning et al., 2006). Bei

Letzterem sind vor allem die transiente Hyperammonämie Irischer Wolfshundwelpen (Meyer et al., 1996; Kerr und van Doorn, 1999; Zandvliet und Rothuizen, 2007) und das Imlerslund-Gräsbeck-Syndrom zu nennen, das unter anderem bei Beagle und Border Collie beschrieben ist (Owczarek-Lipska et al., 2013; Fyfe et al., 2014).

4.6 Sonstige Leberfunktionstests

Vor Etablierung des GST und des ATT kamen als dynamische Leberfunktionstests die Sulfobromophthalein (BSP)- und die Indocyaningrün (ICG)-Elimination zum Einsatz. Beide Verfahren beruhen auf der Injektion eines exogenen Farbstoffes, der über die Leber ausgeschieden wird, gefolgt von einer seriellen Blutprobenentnahme zur Bestimmung der Ausscheidungskinetik (Center et al., 1983; Center, 1990). BSP wurde aufgrund anaphylaktischer Reaktionen beim Menschen vom Markt genommen und ist nicht mehr verfügbar. Die vergleichsweise aufwändige ICG-Elimination wurde durch oben genannte Verfahren abgelöst (Schlesinger und Rubin, 1993).

In der Diskussion beziehungsweise Evaluation sind weitere, teilweise vielversprechende Ansätze wie die Bestimmung von Insulin-like-Growth Factor I (IGF I) (Maxwell et al., 2000; Neumann et al., 2007), der Monoethylglycinoxylidid (MEGX)-Test nach Injektion von Lidocain (Neumann et al., 2011), der orale Galaktosebelastungstest (Venema et al., 2013), die Bestimmung der Caffeinelimination aus seriell entnommenen Blutproben (Boothe et al., 1994; Golden et al., 1994), eine Clearance-Bestimmung anhand radioaktiv markierter Gallensäuren (Bosje et al., 2005), der ¹³C-Aminopyrin-Bluttest (Moeller et al., 2001; Chiaramonte et al., 2003; Moeller et al., 2004) oder die transkutane Messung der ICG-Elimination (Kapitel 5.3.3).

5 Leberfunktionsmessung anhand der Indocyaningrünelimination

5.1 Indocyaningrün (ICG) als fluoreszierende Markersubstanz

5.1.1 *Chemisch-physikalische Eigenschaften von ICG*

Indocyaningrün (ICG) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der ursprünglich für die Nahinfrarot-Fotographie entwickelt wurde und seit 1956 vielseitig in der medizinischen Diagnostik eingesetzt wird (Alander et al., 2012). Die Strukturformel ist in Abbildung II-1 dargestellt. Es handelt sich um ein wasserlösliches, negativ geladenes Ion mit lipophilen Anteilen und einem Molekulargewicht von 751,4 Dalton (Center et al., 1983; Desmettre et al., 2000; Alander et al., 2012).

ICG ist in gelöster Form instabil. Unter Lichteinfluss kommt es zur Zersetzung unter Bildung von Singulett-Sauerstoff (Alander et al., 2012). Die Konzentration von in Wasser gelöstem ICG fällt bei direkter Lichteinstrahlung innerhalb von zehn Stunden um zehn Prozent ab (Gathje et al., 1970). Die Zerfallsrate in destilliertem Wasser liegt dabei über der von anderen wässrigen Lösungen. Durch Dunkelheit, Kühlung und den Zusatz von Plasmaproteinen kann ICG stabilisiert werden (Gathje et al., 1970; Landsman et al., 1976; Saxena et al., 2003). Ebenso ist ICG in konzentrierter Lösung, beispielsweise als kommerziell erhältliches Lyophilisat zur medizinischen Anwendung, nach Anmischen am ersten Tag stabil (Landsman et al., 1976).

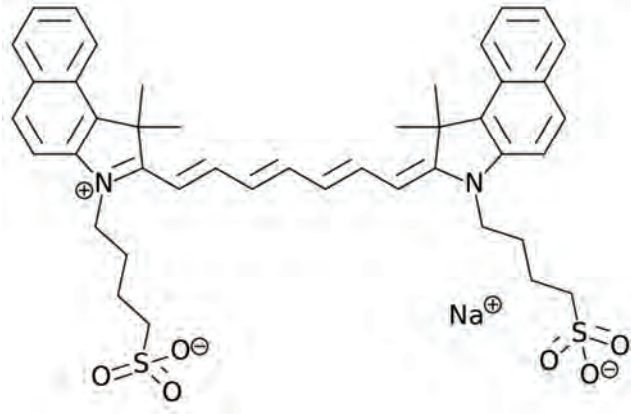
Sowohl Absorptions- als auch Emissionsmaximum von ICG liegen im nahinfraroten Bereich. Das Absorptionsmaximum von ICG-Monomeren beträgt ungefähr 780 nm Wellenlänge. In wässriger Lösung neigt ICG in hohen Konzentrationen zur Aggregation und damit zu Bildung von Polymeren, was das Absorptionsmaximum in Wellenlängenbereiche von bis zu 690 nm verschieben kann (Desmettre et al., 2000). Diese Verschiebung bezeichnet man als Spektralshift. Im Blut lösen sich die Polymere zugunsten der Bindung an Plasmaproteine auf, was ebenfalls die physikalischen Eigenschaften beeinflusst. Nach intravenöser Injektion stellt sich somit innerhalb weniger Sekunden ein Absorptionsmaximum von ungefähr 805 nm ein (Cherrick et al., 1960; Ketterer et al., 1960; Landsman et al., 1976; Desmettre et al., 2000; Saxena et al., 2003; Alander et al., 2012). ICG zur intravenösen Injektion sollte grundsätzlich trotz des schnelleren Abbaus in destilliertem Wasser gelöst werden, da auf diese Weise eine Verschiebung des Absorptionsmaximums vermieden werden kann (Landsman et al., 1976).

Durch die Bestimmung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge mittels Spektrophotometrie kann, unter Zuhilfenahme einer Standardkurve, auf die ICG-Konzentration zurückgeschlossen werden. Beachtet werden muss dabei allerdings, dass aufgrund des Spektralshiftes das Verhältnis zwischen ICG-Konzentration und Absorption

in Konzentrationsbereichen von mehr als 0,015 mg/ml nicht zwingend linear ist (Landsman et al., 1976).

Das Emissionsmaximum von ICG liegt in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 810 bis 820 nm. Es ist ebenfalls von Umgebungsfaktoren wie Temperatur, Lösungsmittel oder der Konzentration abhängig. Nach intravenöser Injektion verschiebt sich so auch die Fluoreszenz von ICG in Wellenlängenbereiche von ungefähr 830 nm. Ab einer ICG-Konzentration von 0,08 mg/ml Vollblut kommt es infolge von Aggregatbildung, Streuung und einer Reabsorption des emittierten Lichts zu einer Abnahme der Fluoreszenz trotz steigender Konzentrationen (Benson und Kues, 1978; Desmettre et al., 2000; Saxena et al., 2003; Alander et al., 2012). Die Fluoreszenz von ICG in Vollblut ist niedriger als in Plasmaproben (Desmettre et al., 2000).

Abbildung II-1: Strukturformel von Indocyaningrün (ICG)



5.1.2 Medizinische Einsatzgebiete von ICG

Kommerziell ist ICG als steriles Lyophilisat zur intravenösen Injektion beim Menschen (beispielsweise ICG-Pulsion®, Pulsion Medical Systems SE) zugelassen. Bei steigendem Einsatz über die letzten Jahrzehnte gilt ICG weiterhin als sicheres Diagnostikum (Sakka et al., 2002). Bei perivaskulärer Injektion tritt keine Gewebeerirritation auf (Center et al., 1983). Auch in hohen Dosierungen sind kaum toxische Wirkungen zu verzeichnen (Alander et al., 2012). Es finden sich vereinzelte Fallberichte und kleinere Fallserien über unerwünschte Arzneimittelwirkungen in Zusammenhang mit dem Einsatz von ICG, die beispielsweise Urtikaria, Übelkeit, Laryngobronchospasmen oder Hypotension, selten auch mit Todesfolge, im Sinne einer idiosynkratischen oder pseudoallergischen Reaktion beschreiben (Benya et al., 1989). Hinweise auf eine Progression der unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei wiederholter Applikation bestehen (Benya et al., 1989). Ein Zusammenhang mit dem geringen Natriumiodidgehalt der kommerziell erhältlichen ICG-

Formulierungen ist möglich, sodass bei bekannter Überempfindlichkeit gegen Iod von einer Anwendung abgeraten wird (Sakka, 2007).

Aufgrund der insgesamt guten Verträglichkeit hat ICG mittlerweile Einzug in viele Teilgebiete der Humanmedizin gehalten. Basierend auf seinen pharmakokinetischen Eigenschaften kommt ICG in der Diagnostik von Lebererkrankungen ein besonderer Stellenwert zu. Hierauf wird in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen. Neben der Evaluation der Leberfunktion kann ICG auch zur Abschätzung des hepatischen Blutflusses herangezogen werden (Clements et al., 1987).

Licht im nahinfraroten Bereich kann Gewebe über einige Millimeter, teilweise auch über weitere Entfernungen, durchdringen, was die Grundlage für die ICG-Fluoreszenz-Angiographie schafft (Alander et al., 2012). Hierbei werden Gefäßverläufe unter Zuhilfenahme spezieller Lichtquellen, Filter und Kameras im Nahinfrarotbereich nach intravenöser Injektion von ICG sichtbar gemacht. Dieses Verfahren ist bereits seit vielen Jahren in der Ophthalmologie zur Visualisierung der retinalen und choroidalen Gefäßversorgung etabliert (Desmettre et al., 2000). Neuere Anwendung findet es aber auch in der Chirurgie zur Darstellung der Vaskularisierung von Tumoren, Gewebeflaps oder Abdominalorganen, zur Metastasensuche oder in der Diagnostik und Therapiekontrolle cerebraler Vasospasmen (Keller et al., 2001; Holm et al., 2002; Toens et al., 2006; Ishizawa et al., 2009; Siedek et al., 2009; Alander et al., 2012).

Verfahren zur ICG-assistierten Lasertherapie zur Koagulation von Gefäßen sind in der Entwicklung (Bäumler et al., 2013). Außerdem können mittels transkutaner Messung der ICG-Konzentration im Blut kardiale Shuntflüsse quantifiziert werden (Bergstra et al., 2009). Eine Messung der unterschiedlichen Blutvolumina kann ebenfalls mit Hilfe von ICG erfolgen (Bradley und Barr, 1968; Hoeft et al., 1994; Haruna et al., 1998).

5.2 Pharmakokinetik der ICG-Elimination

Nach intravenöser Injektion wird ICG innerhalb weniger Sekunden nahezu vollständig an Plasmaproteine gebunden, darunter vor allem Albumin und α -Lipoproteine, aber auch β -Lipoproteine oder Komplementfaktoren (Cherrick et al., 1960; Paumgartner et al., 1970; Muckle, 1976; Center et al., 1983; Center, 1996; Faybik und Hetz, 2006, 2006; Alander et al., 2012; Levesque et al., 2016). Es ist somit eng an das Gefäßkompartiment gebunden und zeigt kaum Extravasation. Das Verteilungsvolumen entspricht weitestgehend dem Plasmakompartiment (Wiegand et al., 1960; Center et al., 1983; Levesque et al., 2016). Die Aufnahme von ICG in die Hepatozyten erfolgt carriervermittelt über einen Organo-Anionen-Transporter (OATP1B3) und den natriumabhängigen Gallensäuretransporter (NTCP) (Graaf et al., 2011). ICG unterliegt keiner Metabolisierung und wird von den Hepatozyten unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch unverändert in die Galle ausgeschieden. Es wird nicht über den Darm rückresorbiert. Somit besteht auch keine

Interferenz mit dem enterohepatischen Kreislauf (Paumgartner et al., 1969; Shinohara et al., 1996; Chijiwa, 2002; Faybik und Hetz, 2006; Weiss et al., 2011; Levesque et al., 2016). Beim Hund konnten 91 bis 97 % des intravenös verabreichten ICG in der Galle nachgewiesen werden (Ketterer et al., 1960; Center et al., 1983). Die extrahepatische Clearance ist vernachlässigbar (Cherrick et al., 1960; Ketterer et al., 1960).

Die Elimination von ICG ist zusammenfassend von drei Hauptfaktoren abhängig: dem hepatischen Blutfluss, der hepatozellulären Aufnahme und der biliären Exkretion.

Die genauen Mechanismen der hepatozellulären Aufnahme sind bislang nicht vollständig geklärt. Es existieren verschiedene Modelle, wonach sowohl ein irreversibler als auch ein reversibler Transport über die Zellmembran der Hepatozyten möglich ist (Kawasaki et al., 1984; Ott et al., 1994; Shinohara et al., 1996; Weiss et al., 2011). Die energieabhängige biliäre Exkretion hingegen stellt einen irreversiblen Vorgang dar (Center et al., 1983; Ott et al., 1994; Weiss et al., 2011).

Hinsichtlich der Plasmaelimination von ICG werden verschiedene pharmakokinetische Modelle beschrieben. Grundsätzlich liegt allen eine Exponentialfunktion nach folgender Gleichung zugrunde:

$$C(t) = C_0 \times e^{-kt} \quad \text{mit} \quad HWZ = \frac{\ln(2)}{k} \approx \frac{0,6931}{k}$$

C = Konzentration

t = Zeit

C₀ = Anfangskonzentration

k = Eliminationskonstante, fraktionelle Extraktion

HWZ = Halbwertszeit

Die meisten Studien gehen von einer biexponentiellen Eliminationskinetik bei Hund und Mensch aus, die sich aus zwei aufeinander folgenden exponentiellen Phasen zusammensetzt. Die initiale schnelle Phase beträgt physiologischerweise nur einige Minuten, während die späte langsame Phase bei niedrigen Plasma-ICG-Konzentrationen über eine Stunde oder deutlich länger beschrieben wird (Leevy et al., 1963; Leevy et al., 1967; Center et al., 1983; Kawasaki et al., 1984; Clements et al., 1987; Ott et al., 1994; Shinohara et al., 1996; Desmettre et al., 2000; Chen et al., 2008).

Ursache ist möglicherweise die biliäre Exkretion als geschwindigkeitslimitierender Schritt, die nach einiger Zeit zu einer Sättigung der hepatozellulären Speicher und somit einer verlangsamten Elimination von ICG aus dem Plasmakompartiment führt. Demnach wird die initale schnelle Phase überwiegend von der hepatozellulären Aufnahmerate und der

Leberdurchblutung bestimmt, während die späte Phase vom intrazytoplasmatischen Transport und der biliären Exkretion abhängt (Leevy et al., 1963; Center et al., 1983; Shinohara et al., 1996). Diskutiert wird auch, dass mit sinkender ICG-Konzentration im Gefäßkompartiment und steigender Konzentration im Leberparenchym ein Rückfluss von ICG aus der Leber ins Blut stattfindet und die Eliminationskinetik verlangsamt (Ott et al., 1994). Eine weitere Theorie zieht eine extrahepatische und extravaskuläre Distribution in Betracht, aus der ICG nach einiger Zeit zurück ins Plasmakompartiment gelangt und auf diese Weise die zweiphasige Eliminationskinetik bedingt (Ott et al., 1994; Shinohara et al., 1996).

Eine Studie, die gesunde Menschen und Menschen mit verschiedenen Lebererkrankungen eingeschlossen hat, postuliert eine triexponentielle Eliminationskinetik (Burns et al., 1991). Dies konnten andere Untersuchungen jedoch nicht bestätigen (Kawasaki et al., 1984; Ott et al., 1994).

Viele pharmakokinetische Ansätze begnügen sich mit einem monoexponentiellen Fitting der Plasma-ICG-Elimination. Das erscheint insbesondere dann sinnvoll, wenn nur einzelne Zeitabschnitte ausgewertet werden, die einer einfachen Exponentialfunktion folgen (Cherrick et al., 1960; Ketterer et al., 1960; Wiegand et al., 1960; Klaassen und Plaa, 1969; Kimura et al., 2001; Chen et al., 2008; Lisotti et al., 2014; Levesque et al., 2016). Diese Technik machen sich auch kommerziell erhältliche pulsdensitometrische Geräte (Kapitel 5.3.3) zu Nutze (Merle et al., 2009; Kland, 2011; Malbrain et al., 2012; Levesque et al., 2016).

Bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen scheint eher eine monoexponentielle Eliminationskinetik vorzuliegen (Wiegand et al., 1960; Clements et al., 1987).

Innerhalb der ersten beiden Minuten nach ICG-Injektion ist bei hochfrequenter arterieller Blutprobenentnahme oder bei transkutaner pulsdensitometrischer Messung (pulsatile Erfassung der arteriellen ICG-Konzentration) zunächst ein hoher Peak zu verzeichnen, gefolgt von einem steilen Abfall der Kurve und einem oder mehreren kleineren Peaks (Bradley und Barr, 1968; Ishigami et al., 1993; Haruna et al., 1998; Weiss et al., 2006; Weiss et al., 2011; Vos et al., 2014). Dieser Kurvenverlauf ist der Mischzeit geschuldet, die benötigt wird, um eine gleichmäßige Verteilung des Indikatorfarbstoffes in der Zirkulation zu erreichen (Weiss, 2009). Der initiale Peak beschreibt das Anfluten unmittelbar im Anschluss an die Injektion, der zweite Peak entsteht im Rahmen der Rezirkulation (Ishigami et al., 1993). Anhand des zeitlichen Verlaufes lassen sich Rückschlüsse auf die kardiale Auswurfleistung ziehen (Vos et al., 2014). Auf den rezirkulatorischen Peak folgt schließlich die Phase der biexponentiellen hepatischen Elimination (Vos et al., 2014). Ein Extrapolieren der Plasma-ICG-Konzentration zum Injektionszeitpunkt (Kapitel 5.3) oder die Schätzung des Blutvolumens aus dem

Kurvenverlauf ist nur bei kurzen Mischzeiten verlässlich, nicht aber bei beispielsweise kritisch kranken Patienten mit stark verminderter Herzauswurfleistung (Weiss, 2009). Bei venöser Blutprobenentnahme sind die initialen Schwankungen deutlich geringer und es ist mit einer Mischzeit von unter einer Minute zu rechnen (Weiss, 2009).

Im Vergleich zu anderen Tierarten und dem Menschen weist der Hund physiologischerweise eine langsamere ICG-Eliminationkinetik auf (Klaassen und Plaa, 1969; Center, 1996). Je nach Untersuchung können die ersten 15 bis 20 Minuten (Ketterer et al., 1960; Center et al., 1983), das Intervall zwischen zehn und 20 Minuten (Weiss et al., 2011) oder sogar die ersten 32 Minuten nach intravenöser ICG-Injektion (Klaassen und Plaa, 1969) mithilfe einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden. Die verzögerte Eliminationskinetik des Hundes im Vergleich zum Menschen spiegelt sich auch bei Betrachtung der Normalwerte der einzelnen Parameter wider (Tabelle II-2).

Eine Studie mit Hunden nach Dimethylnitrosaminintoxikation legt nahe, dass bei diesen Hunden die Aufnahme in die Hepatozyten geschwindigkeitslimitierend und für die verzögerte ICG-Elimination verantwortlich ist (Kawasaki et al., 1984). Neuere Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass eine Beeinträchtigung der ICG-Aufnahmekapazität der Hepatozyten maßgeblich an einer verminderten Plasma-ICG-Clearance beteiligt ist (Weiss et al., 2011).

5.2.1 Kinetik in Abhängigkeit von der ICG-Dosierung

Die Beziehung zwischen Plasma-ICG-Elimination und ICG-Dosierung unterliegt dem Michaelis-Menten-Gesetz (Paumgartner et al., 1969; Paumgartner et al., 1970; Rakich et al., 1987). Demnach steigt die Eliminationsgeschwindigkeit nicht linear mit der Dosis, sondern nähert sich asymptotisch einem Maximum an. Die Michaelis-Menten-Konstante beschreibt dabei die Dosierung, bei der die Hälfte der maximalen hepatischen Eliminationsrate erreicht wird. Beim Hund beträgt sie 1,25 mg/kg ICG (Rakich et al., 1987). Ursache für diesen Zusammenhang ist die carriervermittelte Aufnahme von ICG in die Hepatozyten (Paumgartner et al., 1970). Die Pharmakokinetik von ICG und sämtliche Referenzwerte müssen daher in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis interpretiert werden.

In niedrigen Dosisbereichen von 0,5 mg/kg ist die ICG-Elimination hauptsächlich vom Leberblutfluss abhängig. In hohen Dosisbereichen hingegen, in denen sich die Eliminationsgeschwindigkeit dem Maximalwert annähert, sinkt der Einfluss der Leberdurchblutung auf ein Minimum, während der Einfluss der hepatischen Aufnahmekapazität ansteigt (Paumgartner et al., 1969). Bei Hepatopathien sind hohe Dosierungen somit prinzipiell sensitiver (Leevy et al., 1967; Center, 1996).

Cherrick et al. (1960) hingegen konnten in einer vorangegangenen Studie keinen signifikanten Einfluss der ICG-Dosierung auf die Eliminationskinetik nachweisen.

Ältere Studien zur Leberfunktionsdiagnostik beim Hund arbeiteten überwiegend mit Dosierungen von 1 mg/kg (Center et al., 1983). Im klinischen Einsatz beim Menschen haben sich mittlerweile niedrige Dosierungen von 0,5 mg/kg oder 0,25 mg/kg als ausreichend etabliert (Sakka et al., 2004; Hetz et al., 2006; de Liguori Carino et al., 2009; Halle et al., 2014; Thomas et al., 2015). Die einzige Studie zur transkutanen spektrophotometrischen Messung der ICG-Elimination beim Hund verwendete eine Dosis von 0,5 mg/kg (Grobela et al., 2016).

5.2.2 Weitere Einflüsse auf die ICG-Elimination

Eine kompetitive Hemmung der hepatozellulären ICG-Aufnahme durch Bilirubin ist erwiesen. Daher besitzt der Test bei Serumbilirubinkonzentrationen von über 3 mg/dl beziehungsweise 51 µmol/l oder Ikterus eine eingeschränkte Aussagekraft (Leevy et al., 1967; Paumgartner et al., 1970; Center et al., 1983). Durch steigende Dosierungen von ICG kann der Effekt minimiert werden (Paumgartner et al., 1969). Erhöhte Serumgallensäurenkonzentrationen interferieren hingegen eher nicht mit der ICG-Aufnahme (Paumgartner et al., 1969).

Da die biliäre Exkretion von ICG ATP-abhängig ist, steht die Eliminationskinetik von ICG im Gegensatz zu anderen Leberfunktionstests in direktem Zusammenhang zur Energieversorgung der Leber (Chijiwa, 2002).

Bei plötzlichem Einbruch der ICG-Elimination innerhalb von Stunden muss vor allem eine verminderte Blutversorgung der Leber in Betracht gezogen werden, beispielsweise durch Verlegung der *Arteria hepatica* oder der Pfortader (Sakka, 2007; Thümer et al., 2007). Nach Induktion einer schweren Blutung wurde beim Hund ein schneller Anstieg der ICG-Halbwertszeit infolge einer verringerten arteriellen Leberperfusion nachgewiesen (Nxumalo et al., 1977). Der Einfluss des hepatischen Blutflusses wird kontrovers diskutiert. Einige sprechen ihm einen großen Einfluss zu (Nxumalo et al., 1977; Sakka und van Hout, 2006; Malbrain et al., 2012), während andere ihn eher als vernachlässigbar ansehen (Weiss et al., 2011). Zur besseren Vergleichbarkeit sollte grundsätzlich auf einen euvolämischen Status des zu untersuchenden Patienten geachtet werden (Center, 1996).

Körperliche Anstrengung oder Medikamente, die auf das kardiovaskuläre System wirken, nehmen ebenfalls Einfluss auf die ICG-Elimination. So verursacht bereits fünfzehnminütiges Stehen im Vergleich zu liegenden Probanden eine signifikant längere Halbwertszeit beim Menschen (Daneshmend et al., 1981). Desweiteren nimmt die Geschwindigkeit der ICG-Elimination beim Mensch mit steigendem Alter langsam ab

(Huber et al., 2013). Unter denselben Bedingungen und bei derselben Person hingegen weist die ICG-Elimination eine gute Reproduzierbarkeit auf (Daneshmend et al., 1981).

5.3 Messverfahren der ICG-Elimination

5.3.1 *Invasive Messung mittels seriell entnommener Blutproben*

Hierbei handelt es sich um das traditionelle Verfahren zur Evaluation der Plasma-ICG-Elimination, das nach wie vor als Goldstandard gilt (Faybik et al., 2004; Faybik und Hetz, 2006; Levesque et al., 2016). Grundsätzlich sollte der Patient zum Zeitpunkt der Testdurchführung nüchtern sein, um eine Beeinträchtigung durch Durchblutungsschwankungen im Gastrointestinaltrakt und Hepatosplanchnikusgebiet im Rahmen der Verdauung auszuschließen (Center et al., 1983).

Sowohl vor intravenöser Injektion als auch danach werden in engmaschigem Abstand zu definierten Zeitpunkten Blutproben entnommen. Wichtig ist, dass ICG-Injektion und Blutprobenentnahme über unterschiedliche Gefäßzugänge erfolgen. Die Injektion von ICG sollte zügig erfolgen. Nach Zentrifugation wird die Plasma-ICG-Konzentration traditionell durch Messung der Absorption in einem Spektrophotometer bei einer definierten Wellenlänge, meist 805 nm, bestimmt. Bei dieser Wellenlänge besteht keine Interferenz beispielsweise mit Bilirubin oder Hämoglobin. Als Vergleich dient eine Standardkurve, die anhand einer Verdünnungsreihe der verwendeten ICG-Lösung und der Plasmaprobe vor ICG-Injektion erstellt wird. Die Plasma-ICG-Eliminationskurve erhält man durch Auftragen der jeweiligen ICG-Konzentration gegen die Zeit (Center et al., 1983). Neben der klassischen spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung sind eine spezifische Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) (Chen et al., 2008), eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Purcell et al., 2006) sowie fluoreszenzbasierte Methoden (Dorr und Pollack, 1989) etabliert.

In der Regel wird heparinisiertes Plasma als Probenmaterial verwendet (Ketterer et al., 1960; Wiegand et al., 1960; Center et al., 1983; Kawasaki et al., 1984; Grobelna et al., 2016). Einzelne Arbeitsgruppen arbeiten mit EDTA-Plasma (Hsieh et al., 2004; Chen et al., 2008) oder Oxalat-Plasma (Klaassen und Plaa, 1969). Ebenso kann die Serum-ICG-Elimination bestimmt werden (Cooke et al., 1963; Hashimoto und Watanabe, 2000; Bäumler et al., 2013; Lisotti et al., 2014). Letzteres kann die Hintergrundtrübung, die bei Plasma häufig auftritt, minimieren (Chen et al., 2008; Lisotti et al., 2014). Der in der Literatur gebräuchlichere Terminus der Plasma-ICG-Elimination kann somit weitestgehend deckungsgleich mit der in der vorliegenden Studie bestimmten Serum-ICG-Elimination verwendet werden.

Die Frequenz der Blutprobenentnahmen variiert stark. Center et al. schlagen für den Hund folgende Zeitpunkte vor: Basalwert vor ICG-Injektion sowie 3, 6, 9, 12, 15, 30 und 45 Minuten nach Injektion (Center et al., 1983). Aufgrund der Instabilität von ICG sollten die Proben nach Zentrifugation bis zur Analyse eingefroren werden (Center et al., 1983).

5.3.2 Invasive Messung mittels fiberoptischen Katheters

Durch Einlegen eines fiberoptischen Katheters über die *Arteria femoralis* in die Aorta kann die Blut-ICG-Konzentration spektrometrisch zuverlässig bestimmt werden (Faybik et al., 2004; Sakka und van Hout, 2006). Aufgrund der Invasivität dieses Verfahrens wurde es jedoch nur begrenzt eingesetzt und gilt mittlerweile als überholt (Levesque et al., 2016).

5.3.3 Transkutane pulsdensitometrische Messung

Bereits 1967 wurde die Plasma-ICG-Elimination transkutan mittels Ohrdensitometer erfolgreich bestimmt (Leevy et al., 1967). Diese Technik wurde mittlerweile weiterentwickelt, sodass in der Humanmedizin die transkutane Messung der ICG-Elimination zum intensivmedizinischen Standard zählt. Verschiedene kommerzielle Systeme mit computergestützter Auswertung sind erhältlich (z. B. LiMON^a; DDG-3300K^b). Das Verfahren ist vergleichbar mit der Pulsoxymetrie und misst die Absorption von nahinfrarotem Licht durch das im Blut vorhandene ICG spektrophotometrisch über einen Fingersensor (Kland, 2011; Halle et al., 2014). Auf diese Weise wird pulsatil die arterielle ICG-Konzentration in Relation zur Hämoglobinkonzentration bestimmt (Haruna et al., 1998; Hori et al., 2006). Die Pulsdensitometrie stellt ein Teilgebiet der Spektrophotometrie dar.

In mehreren humanmedizinischen Studien wurde eine enge Korrelation der transkutanen pulsdensitometrischen Messung mit der seriellen Blutprobenentnahme oder der fiberoptischen Messung nachgewiesen (Sakka et al., 2000; Faybik et al., 2004; Purcell et al., 2006).

Mit der Etablierung der transkutanen Pulsspektrophotometrie erschloß sich angesichts der vielen Vorteile ein weites Einsatzgebiet. Die Messung ist nicht invasiv, einfach durchführbar und erfordert keine wiederholten Blutprobenentnahmen. Eine bettseitige Anwendung im Rahmen einer intensivmedizinischen Überwachung oder während Anästhesien ist komplikationslos möglich. Zudem liegen die Ergebnisse unmittelbar vor, sodass auch engmaschige Kontrollmessungen bei Patienten im Leberversagen oder nach Lebertransplantation ermöglicht werden (Sakka, 2007; Levesque et al., 2016).

^a Pulsion Medical Systems SE, München, Deutschland

^b Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan

5.3.4 Transkutane fluorometrische Messung

Basierend auf der fluoreszierenden Eigenschaft von ICG kann die Plasmakonzentration nicht nur anhand der Absorption von nahinfrarotem Licht (Kapitel 5.3.3), sondern auch anhand der Lichtemission gemessen werden. Im Rattenmodell wurde die Fluoreszenz von ICG erstmalig erfolgreich transkutan detektiert (Dorshow et al., 1998). Es existieren auf dieser Grundlage allerdings bislang keine kommerziell erhältlichen Systeme zur Leberfunktionsdiagnostik.

Einige experimentelle Studien machen sich fluoreszierende Markersubstanzen zur Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) der Niere zunutze (Schock-Kusch et al., 2011; Schreiber et al., 2012; Steinbach et al., 2014; Ellery et al., 2015). Das hier verwendete NIC-Device^a sendet Licht einer definierten Wellenlänge über Leuchtdioden aus und registriert das von der Markersubstanz emittierte Licht mittels Photodiode.

In Kooperation mit der Mannheim Pharma und Diagnostics GmbH und dem Zentrum für Medizinische Forschung der medizinischen Fakultät Mannheim wurde in der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Pilotstudie zur transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination bei Hunden und Katzen mithilfe eines abgewandelten NIC-Device durchgeführt (Strommer et al., 2015). Verwendet wurde exzitatorisches Licht der Wellenlänge 760 nm, mittels Photodiode wurde emittiertes Licht der Wellenlänge 820 nm registriert. An der Studie nahmen jeweils drei gesunde Hunde und Katzen teil. Die Ergebnisse hinsichtlich Durchführbarkeit und Akzeptanz waren vielversprechend. Als ideal ergab sich eine ICG-Dosierung von 0,2 mg/kg und ein Anbringen des Devices an der Brust- oder Bauchwand. Bislang ist die Studie lediglich in Form eines Abstracts publiziert.

Die Evaluation der transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination bei Hunden mit ePSS, aufbauend auf den Resultaten von Strommer et al. (2015), ist Thema der vorliegenden Studie.

5.4 Messgrößen der ICG-Elimination

Zu den klassischen Parametern der Plasma-ICG-Elimination gehören die Halbwertszeit (HWZ), die fraktionelle Extraktion (k) und die Plasmaverschwinderate (PDR, plasma disappearance rate). Sie ergeben sich direkt aus der zugrundeliegenden Exponentialfunktion

$$C(t) = C_0 \times e^{-kt} \quad (\text{Kapitel 5.2})$$

$$\text{wobei gilt:} \quad HWZ(\text{Min}) = \frac{\ln(2)}{k} \approx \frac{0,6931}{k}$$

$$\text{und:} \quad PDR(\%/Min) = k \times 100$$

^a Mannheim Pharma und Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

(Center et al., 1983).

Durch Logarithmieren ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der fraktionellen Extraktion k entspricht. Durch Extrapolation erhält man die theoretische Anfangskonzentration C_0 zum Zeitpunkt der ICG-Injektion (Leevy et al., 1967).

Bei der transkutanen und der fiberoptischen Messmethode wird im Gegensatz zur invasiven Messung mittels serieller Blutprobenentnahme mit prozentualen Angaben gearbeitet. Hierzu wird die Anfangskonzentration C_0 durch 100 % ersetzt und der anschließende Abfall in Relation dazu angegeben (Sakka und van Hout, 2006).

Üblich ist auch die Angabe prozentualer Retentionsraten, beispielsweise der 15-Minuten-Retentionsrate (R_{15}). Sie beschreibt das Verhältnis aus Anfangskonzentration C_0 und der Plasma-ICG-Konzentration 15 Minuten nach Injektion und berechnet sich, wie folgt (Halle et al., 2014):

$$R_{15}(\%) = \frac{C_{15 \text{ Min}}}{C_0} \times 100$$

Die Plasmaclearance von ICG ergibt sich folgendermaßen (Center et al., 1983):

$$Clearance_{ICG} (ml/Min/kg) = k \times \text{Verteilungsvolumen}$$

$$\text{wobei gilt:} \quad \text{Verteilungsvolumen} = \frac{\text{Gesamtdosis ICG}}{C_0}$$

Alternativ lässt sich die Plasmaclearance auch aus der *Area under the Curve* (AUC) ableiten (Grobelna et al., 2016):

$$Clearance_{ICG} (ml/Min/kg) = \frac{\text{Gesamtdosis ICG}}{AUC}$$

Die Plasmaclearance lässt sich nur mit Kenntnis der absoluten Plasma-ICG-Konzentration (oder aber des Verteilungsvolumens) bestimmen. Sie ist daher der invasiven Messung durch serielle Blutprobenentnahme vorbehalten. Die transkutane Messmethode verwendet hingegen prozentuale Werte, weshalb auf die PDR zurückgegriffen werden muss. Die ICG-PDR wird der ICG-Clearance als weitestgehend ebenbürtig angesehen (Sakka und van Hout, 2006; Halle et al., 2014).

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der transkutanen Messmethode stellen die ICG-PDR und die R_{15} mittlerweile die Parameter mit der weitesten Verbreitung dar (Halle et al., 2014).

In Tabelle II-2 sind die Normalwerte einiger Parameter der Plasma-ICG-Elimination für Mensch und Hund zusammengefasst.

Tabelle II-2: Normalwerte der Plasma-ICG-Elimination für Mensch und Hund

teilweise mit Angabe der Standardabweichung, der verwendeten ICG-Dosierung und des Messverfahrens

Parameter	Mensch	Hund
Clearance (ml/Min/kg)	8,9 (0,5 mg/kg ICG) ^a 6-12 ^b 7,5 ± 2 (0,5 mg/kg ICG) ^c >700 ml/Min/m ² ^d >500-750 ml/Min/m ² ^e	3,7 ± 0,7 (1 mg/kg ICG) ^f 3,9 ± 0,7 (1,5 mg/kg ICG) ^f 3,2 ± 1,0 (0,4-0,6 mg/kg ICG) ^g 3,8 ± 0,6 (0,5 mg/kg ICG) ^a
PDR (%/Min)	≥18 ^{bd} 18,6 ± 2,8 (0,5 mg/kg ICG) ^c 18-25 ^h	6,9 (0,4-0,6 mg/kg ICG) ^g 8,1 ± 1,7 (1 mg/kg ICG) ^f 8,7 ± 2,2 (1,5 mg/kg ICG) ^f 8,6 ± 1,8 (0,5 mg/kg ICG, invasiv) ^a 7,8 ± 2 (0,5 mg/kg ICG, pulsdensitometrisch) ^a
R15 (%)	<10 ^b 8 ± 4,7 (0,5 mg/kg ICG) ⁱ 8 (0,5 mg/kg ICG) ^j	28,1 ± 7,3 (0,5 mg/kg ICG, invasiv) ^a 32,3 ± 9,2 (0,5 mg/kg ICG, pulsdensitometrisch) ^a
R30 (%)		≤14,7 ± 5 (1 mg/kg ICG) ^f ≤11,4 ± 3 (1,5 mg/kg ICG) ^f
HWZ (Min)	3-5 ^b 3,8 ± 0,65 (0,5 mg/kg ICG) ^c	9 ± 2 (1 mg/kg ICG) ^f 8,4 ± 1,9 (1,5 mg/kg ICG) ^f 10,8 ± 1,0 (0,4-0,6 mg/kg ICG) ^g 8,4 ± 1,8 (0,5 mg/kg ICG) ^a

^a Grobelna et al. (2016)

^b Vos et al. (2014)

^c Wiegand et al. (1960)

^d Sakka (2007)

^e Sakka und van Hout (2006)

^f Center et al. (1983)

^g Ketterer et al. (1960)

^h Huber et al. (2013)

ⁱ Ishigami et al. (1993)

^j Lau et al. (1997)

5.5 Bedeutung der ICG-Elimination in der Leberfunktionsdiagnostik

5.5.1 Humanmedizin

Seit der Entwicklung der transkutanen pulsdensitometrischen Messung stellt die ICG-Elimination einen essentiellen dynamischen Leberfunktionstest von hohem prognostischem Wert dar. Aus der Hepatologie, der Transplantationsmedizin und der Intensivmedizin sind ICG-PDR und -R15 nicht mehr wegzudenken.

Bei Patienten mit Leberzirrhose erwiesen sich ICG-PDR und -R15 als verlässliche Leberfunktionparameter mit signifikanter Korrelation zu komplexen Scoring-Systemen wie MELD (model for end-stage liver disease), MELD-Na (MELD kombiniert mit Serumnatriumkonzentration) und CTP (Child-Turcotte-Pugh Score) (Sheng et al., 2009; Cheng et al., 2016). Die R15 wurde als bester diagnostischer Marker einer klinisch relevanten portalen Hypertension und dadurch bedingter Ösophagusvarizen identifiziert (Lisotti et al., 2014).

Bei akutem Leberversagen bleibt bei einer ICG-PDR von $\leq 6,3$ %/Min eine spontane Erholung mit einer Sensitivität von 85,7 % und einer Spezifität von 88,9 % aus (Merle et al., 2009). Desweiteren ist eine ICG-PDR < 10 %/Min innerhalb von 72 Stunden nach Lebertransplantation das häufigste Anzeichen einer frühen Transplantatdysfunktion. Sie ist diesbezüglich der Serumbilirubinkonzentration und anderen konventionellen Parametern überlegen (Hetz et al., 2006; Hori et al., 2006).

Bei Teilhepatektomie aufgrund von Neoplasien der Leber dienen ICG-PDR und -R15 prä- und intraoperativ der Vorhersage der verbleibenden Leberfunktion nach Resektion (Lau et al., 1997; Thomas et al., 2015).

Weite Verbreitung findet die Messung der ICG-Elimination auch im Rahmen der intensivmedizinischen Überwachung von nicht primär leberkranken Patienten. Bei kritisch kranken Patienten besteht mit einer medianen ICG-PDR von 16,5 %/Min beziehungsweise 6,4 %/Min ein signifikanter Unterschied zwischen Überlebenden und Nichtüberlebenden (Sakka et al., 2002). Eingeschlossen in diese Studie wurden Patienten mit ARDS (acute respiratory distress syndrome), Sepsis, schwerem Kopftrauma, intrakranieller Blutung oder hämorrhagischem Schock. Bei Patienten auf der Intensivstation mit einer ICG-PDR < 8 %/Min liegt die Mortalität bei ungefähr 80 % (Sakka et al., 2002; Halle et al., 2014). Sensitivität und Spezifität der ICG-PDR sind vergleichbar mit der komplexer Scoring-Systeme wie APACHE (acute physiology and chronic health evaluation) II und SAPS (simplified acute physiology score) II (Sakka et al., 2002) und sind konventionellen Leberfunktionsparametern überlegen (Malbrain et al., 2012; Halle et al., 2014). Bei septischen Patienten stellt die ICG-PDR einen verlässlichen und frühen Indikator einer reversiblen Leberschädigung dar (Kimura et al., 2001).

5.5.2 Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin war die Messung der Plasma-ICG-Elimination mittels serieller Blutprobenentnahmen als Diagnostikum von Leberfunktionsstörungen früher regelmäßiger im Einsatz (Center et al., 1983; Prasse KW et al., 1983; Rakich et al., 1987). Aufgrund der aufwendigen Durchführung wurde sie jedoch von den einfacheren dynamischen Tests GST und ATT verdrängt (Center, 1996).

Darüber hinaus diente der Hund neben anderen Tierarten in verschiedenen pharmakokinetischen Studien zur ICG-Elimination als Modell für den Menschen (Klaassen und Plaa, 1969; Weiss et al., 2011).

Angeichts des Erfolges, mit dem die transkutane pulsdensitometrische Messmethode Einzug in die Humanmedizin gehalten hat, gibt es mittlerweile Bestrebungen, dieses Verfahren in der Veterinärmedizin zu etablieren. Bislang hat eine Studie den Einsatz des humanmedizinischen pulsdensitometrischen Systems LiMON^a bei acht gesunden Beagle in Anästhesie und unmittelbar nach dem Aufwachen aus Narkose überprüft (Grobela et al., 2016). Verwendet wurde ICG in einer Dosierung von 0,5 mg/kg als intravenöse Injektion. Die spektrophotometrische Messung von PDR und R15 erfolgte über einen Fingersensor, der nach Freischeren an der Rute befestigt wurde. Zeitgleich wurden Plasma-ICG-Clearance und R15 mittels serieller Blutprobenentnahme bestimmt. Eine gute Korrelation ergab sich lediglich für Plasma-ICG-Clearance und ICG-PDR direkt im Anschluss an die Anästhesie.

Wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben, wurde außerdem in der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Pilotstudie zum Einsatz der transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination bei Hunden und Katzen durchgeführt (Strommer et al., 2015). Studien zum Einsatz transkutaner Messverfahren bei Hunden mit Leberdysfunktion fehlen bislang. Die vorliegende Arbeit ist eine Folgestudie von Strommer et al. (2015) unter Verwendung derselben abgewandelten NIC-Devices. Sie überprüft die Anwendbarkeit der transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination bei Hunden mit Leberfunktionsstörung. Als Modellerkrankung dient der kongenitale ePSS vor und nach chirurgischem Verschluss des Shuntgefäßes.

^a Pulsion Medical Systems SE, München, Deutschland

III Material und Methoden

Für die Durchführung der Studie lag eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vor (V 54 – 19c2015h01 Gl 18/17 r. 24/2013).

1 Patientenauswahl

In die prospektive Studie wurden zehn Hunde eingeschlossen, bei denen ein singulärer ePSS diagnostiziert worden war und die zum chirurgischen Verschluss des Shuntgefäßes in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurden. Die Besitzer der Hunde wurden im Vorfeld über den Ablauf der Studie informiert. Einschlusskriterium war die Unterzeichnung einer Einverständiserklärung (IX Anhang, Abbildung IX-1). Es wurden nur Hunde in die Studie eingeschlossen, deren Besitzer sich bereit erklärten, die Hunde zu einer Kontrolluntersuchung ungefähr drei Monate nach chirurgischem Verschluss des Shuntgefäßes (Dreimonatskontrolle) erneut vorzustellen.

Alle Hunde waren über mindestens vier Wochen vorbehandelt mit Laktulose (variable Dosis) und einem Protonenpumpeninhibitor (Omeprazol oder Lansoprazol, 1 mg/kg/d oral) sowie auf eine leberschonende Diät^a eingestellt worden.

Es wurden nur Hunde in die Studie eingeschlossen, bei denen keine Beeinträchtigung durch die Menge der geplanten Blutprobenentnahmen zu erwarten war. Die Entscheidung wurde individuell anhand des aktuellen Hämatokritwertes, des Körpergewichtes sowie des Allgemeinbefindens getroffen. Hunde mit einem Körpergewicht von weniger als 3 kg wurden von der Studie ausgeschlossen.

Als weitere Ausschlusskriterien wurden eine schwere kardiale Erkrankung, bei der eine Minderperfusion von Haut oder Abdominalorganen aufgrund einer verringerten Herzauswurfleistung nicht auszuschließen war, andere konkurrierende Erkrankungen, die nicht mit dem PSS in Zusammenhang stehen, die Verabreichung von Medikamenten mit Wirkung auf das kardiovaskuläre System und ein Ikterus oder eine Hyperbilirubinämie von mehr als 51 µmol/l (entspricht 3 mg/dl) festgelegt.

^a Hill's™ Prescription Diet™ Canine I/d™, Hill's Pet Nutrition GmbH, Hamburg, Deutschland; Hepatic Canine, ROYAL CANIN Tiernahrung GmbH, Köln, Deutschland; zusätzlich gegebenenfalls Milcheiweißprodukte (Quark, Hüttenkäse), Kohlenhydrate (Reis, Nudeln)

2 Voruntersuchungen

Sämtliche Befunde, die im Rahmen der Voruntersuchungen des chirurgischen Verschlusses des PSS und der Splenoportographie erhoben wurden, wurden in der Praxisverwaltungssoftware^a der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen dokumentiert.

Die Voruntersuchungen fanden vor dem chirurgischen Verschluss des Shuntgefäßes (Eingriff) und im Rahmen der Kontrolluntersuchung ungefähr drei Monate nach Eingriff (Dreimonatskontrolle) in gleicher Weise statt.

Zum Zeitpunkt der Voruntersuchungen waren die Hunde seit mindestens zwölf Stunden nüchtern.

2.1 Anamnese und allgemeine Untersuchung

Es wurde vorgängig eine ausführliche Anamnese zur Evaluation der Symptomatik und zur Erkennung möglicher konkurrierender Erkrankungen durchgeführt. Das aktuelle Körpergewicht wurde ermittelt und protokolliert. Alle Hunde wurden vor Durchführung der Studie gründlich allgemein untersucht. Hierzu zählten Bestimmung von Atem-, Herz- und Pulsfrequenz, Messung der rektalen Körperinnentemperatur, Abdomenpalpation, Palpation der peripheren Lymphknoten sowie Auskultation von Herz und Lunge. Zur Evaluierung des Hydratations- und Volumenstatus wurden zusätzlich Hautturgor und Schleimhäute inklusive Bestimmung der kapillären Rückfüllzeit kontrolliert.

2.2 Laboruntersuchungen

Die hämatologische Untersuchung wurde an einem Hämatologiesystem^b aus mit EDTA antikoaguliertem Vollblut durchgeführt. Die Messung umfasste: Hämatokrit (Hkt), Erythrozytenzahl (RBC), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV) und Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHr).

Folgende blutchemische Parameter wurden aus Plasma, das nach Zentrifugation aus mit Heparin antikoaguliertem Vollblut gewonnen worden war, bestimmt^c: Bilirubin (Bili), Albumin (Alb), Harnstoff (Urea), Cholesterin (Chol) und Glukose (Glu).

Als etablierte dynamische Leberfunktionstest wurden ein GST und ein oraler ATT angeschlossen. Die Serumgallensäurenkonzentration^c wurde aus periphervenös entnommenen Blutproben präprandial (GS-0) sowie zwei Stunden nach Fütterung von zwei Esslöffeln einer leberschonenden Diät^d (GS-2) bestimmt (Center, 1996). Falls bereits ein aktueller GST im Rahmen der Erstvorstellung zur Diagnose des PSS in der

^a EasyVET, IFS Informationssysteme GmbH, Hannover, Deutschland

^b ADVIA 2120, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland

^c ABX Pentra 400, Horiba ABX SAS, Montpellier, Frankreich

^d Hill'sTM Prescription DietTM Canine l/dTM, Hill's Pet Nutrition GmbH, Hamburg, Deutschland; Hepatic Canine, ROYAL CANIN Tiernahrung GmbH, Köln, Deutschland

Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt worden war, wurden dessen Resultate übernommen. Der GST wurde als positiv bewertet, wenn GS-0 oder GS-2 oder beide Werte oberhalb des Referenzbereiches lagen.

Die Messung der Blutammoniakkonzentration erfolgte mit einem etablierten Point-of-care Analysegerät^a aus nichtkoaguliertem, frisch periphervenös gewonnenem Vollblut (Goggs et al., 2008). Der Basalwert (NH₃-0) wurde zeitgleich mit GS-0 bestimmt. Für den oralen ATT wurde der leberschonenden Diät Ammoniumchloridlösung^b beigemischt. Im Anschluss wurde die Ammoniakkonzentration im Blut nach 30 (NH₃-30) und 45 Minuten (NH₃-45) bestimmt. Lag NH₃-0 oberhalb von 100 µmol/l, wurde auf einen ATT verzichtet. Als Referenzbereich für die Blutammoniakkonzentration wurde eine obere Grenze von 60 µmol/l festgelegt (Goggs et al., 2008). Der ATT wurde als positiv bewertet, wenn mindestens einer der drei Werte oberhalb des Referenzbereiches lag. Der Messbereich des verwendeten Analysegerätes beträgt 6-286 µmol/l. Blutammoniakkonzentrationen, die unter- oder oberhalb dieses Bereiches lagen, wurden mit „low“ beziehungsweise „high“ gekennzeichnet und für die nachfolgende Analysen mit 6 µmol/l beziehungsweise 286 µmol/l gleichgesetzt.

Abgesehen von der Bestimmung der Blutammoniakkonzentration, die unmittelbar mit Point-of-care Analysegerät erfolgte, wurden sämtliche Laboruntersuchungen im Zentrallabor der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen durch ausgebildete medizinisch-technische Laboranten durchgeführt. Die jeweiligen Referenzbereiche sind angegeben.

2.3 Sonographie

Bei allen Hunden wurden die abdominalen Gefäße und die Leber dopplersonographisch^c untersucht, der PSS dargestellt und hinsichtlich der Shuntlokalisierung klassifiziert. Die Sonographie wurde bei allen Hunden von einem Diplomate des European College of Veterinary Internal Medicine, Companion Animal, Kardiologie (Dipl. ECVIM-CA (Cardiology)) durchgeführt.

Zum Ausschluss einer schweren kardialen Grunderkrankung wurde vor dem Eingriff durch denselben Untersucher eine Echokardiographie (Längsachse, Vierkammerblick, in rechtsparasternaler Anschallung)^c durchgeführt.

^a PocketChem BA PA-4130, Arkray, Inc., Kyoto, Japan

^b 100 mg/kg Ammoniumchlorid oral, maximal 3 g, in Form einer 10%igen Ammoniumchloridlösung (Herstellung durch Apotheke)

^c CX50, Philips GmbH, Hamburg, Deutschland

3 Messung der ICG-Elimination

Die Messung der ICG-Elimination erfolgte bei jedem Hund am Tag der Voruntersuchungen vor dem Eingriff sowie im Rahmen der Dreimonatskontrolle.

Die ICG-Elimination wurde simultan auf zwei Arten bestimmt: nichtinvasiv mittels transkutaner fluorometrischer Messung (im Folgenden auch: transkutane Messmethode) und invasiv aus seriell entnommenen Blutproben (im Folgenden auch: invasive Messmethode).

Der Studienablauf wurde genau protokolliert (IX Anhang, Abbildung IX-2).

3.1 Vorbereitung des Hundes

Dem Hund wurden zwei Venenverweilkatheter (20 oder 22 Gauge) in die rechte oder linke *Vena saphena lateralis* oder *Vena cephalica antebrachii* eingelegt. Ein Venenverweilkatheter wurde als Injektionsvenenkatheter (Injektion von ICG) und einer als Messvenenkatheter (serielle Blutprobenentnahme) definiert.

Es wurde beidseits an der ventralen seitlichen Thoraxwand jeweils eine Fläche von ungefähr 8 cm x 6 cm zum Aufbringen der Messeinheit (Device) freigeschoren.

3.2 Aufbau der Devices

Zur transkutanen fluorometrischen Messung der Blut-ICG-Elimination wurde ein abgewandeltes NIC-Device^a (Schock-Kusch et al., 2011), wie es bereits von Strommer et al. (2015) eingesetzt worden waren, verwendet.

Das Device besitzt an der Unterseite zwei Leuchtdioden mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 760 nm. Dazwischen befindet sich eine Photodiode, die Licht einer Wellenlänge von 820 nm detektiert. Hierzu sind verschiedene Lichtfilter über der Photodiode aufgebracht. Die Energieversorgung wird über eine kleine, wiederaufladbare Batterie sichergestellt, die an dem Device befestigt wird. Die registrierten Lichtsignale werden intern auf dem Device gespeichert. Anschließend können die Daten computergestützt über einen Mini-USB-Anschluss in ein Tabellenkalkulationsprogramm^b ausgelesen werden.

Die Maße des Devices betragen 19 x 11 x 5 mm (Höhe x Breite x Tiefe) und die Maße der Batterie 20 x 9 x 4 mm. Der Aufbau des Devices ist in Abbildung III-1 bis Abbildung III-4 dargestellt.

^a Mannheim Pharma und Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

^b Microsoft Excel 2010, Microsoft Corporation, Redmond, USA

Abbildung III-1: Device zur Messung der transkutanen fluorometrischen ICG-Elimination in der Aufsicht



Abbildung III-2: Device konnektiert mit zugehöriger Batterie



Abbildung III-3: Unterseite des Devices mit Blick auf die beiden Leuchtdioden (außen, rot blinkend) und die Photodiode (mittig, schwarz)



Abbildung III-4: Device konnektiert über Mini-USB-Anschluss zur computergestützten Auslesung der Messdaten



3.3 Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination

Für jeden Messvorgang wurden zwei Devices eingesetzt. Sie wurden zunächst mit der Unterseite so auf spezielle, beidseits klebende Pflaster^a aufgebracht, dass beide Leuchtdioden und die Photodiode in einem freiliegenden Fenster platziert waren. Danach wurden die zugehörigen Batterien mit den Devices konnektiert und mit Klebeband^b fixiert. Je ein Device wurde auf jeder Thoraxseite auf die zuvor freigeschorene Haut aufgebracht und dort mit Klebevlies fixiert^c. Eine schwarze lichtundurchlässige Folie und eine Lage handelsüblicher Aluminiumfolie wurden als Lichtschutz über die Devices gelegt und mit einem Schulterverband aus selbstklebender elastischer Binde^d befestigt. Bei Hund 1 und Hund 2 vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle von Hund 1 wurde auf die Aluminiumfolie verzichtet. Der schrittweise Ablauf kann Abbildung III-5 und Abbildung III-6 entnommen werden.

Es wurde eine Backgroundmessung von fünf Minuten durchgeführt. In dieser Zeit wurden keine Manipulationen am Hund vorgenommen.

^a Sonderanfertigung, Lohmann GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland

^b 3M Durapore, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland

^c Rudavlies, NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter, Deutschland

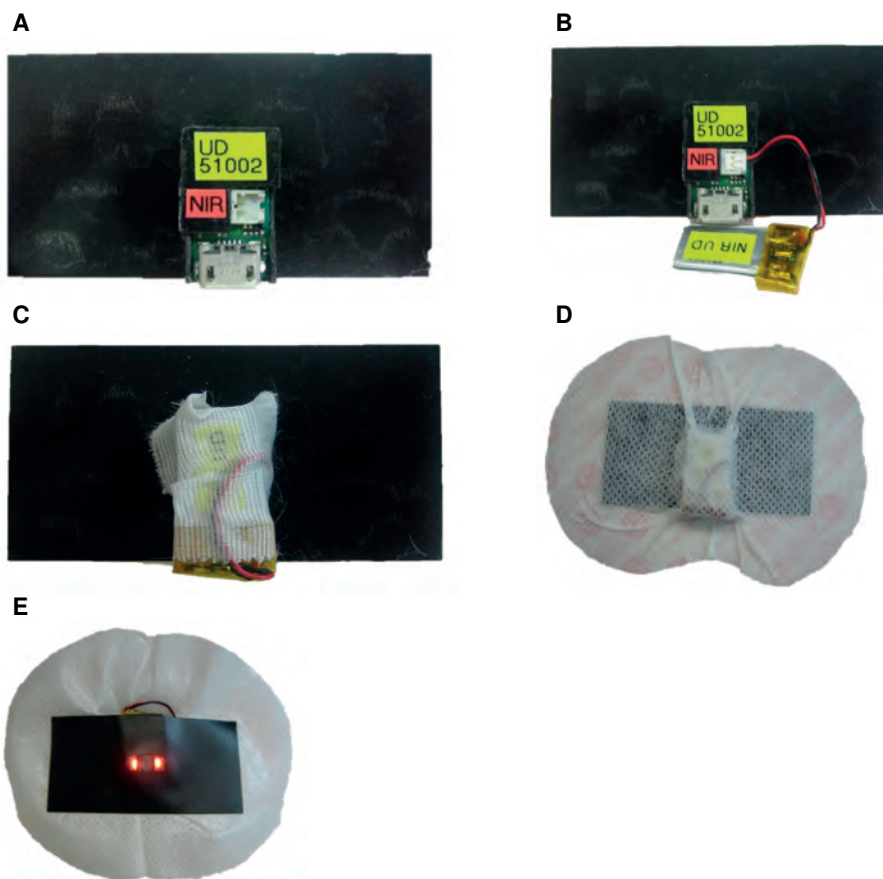
^d Eickwrap elastischer Verband, Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen, Deutschland

Die ICG-Injektion erfolgte zügig in einer Dosierung von 0,2 mg/kg Körpergewicht (Strommer et al., 2015) über den Injektionsvenenkatheter. Verwendet wurde ein für die intravenöse Injektion beim Menschen zugelassenes Lyophilisat^a, das unmittelbar vor Verwendung mit Wasser für Injektionszwecke^b gemäß Herstellerangaben zu einer 0,5%-igen Lösung rekonstituiert wurde. Danach wurde der Venenverweilkatheter mit 5 ml einer isotonen Natriumchloridlösung^c gespült.

Im Anschluss an die letzte Blutprobenentnahme 64 Minuten nach ICG-Injektion (Kapitel 3.4) wurden Verband und Devices abgenommen. Die Auslesung der Daten erfolgte computerbasiert wie vorgängig beschrieben.

Abbildung III-5, A-E: schrittweise Vorbereitung des Devices zum Aufbringen auf den Patienten

E: Unterseite des vorbereiteten Devices, Leuchtdioden und Photodiode liegen frei zum direktem Kontakt mit der Haut



^a ICG-Pulsion 25 mg, 5 mg/ml, Pulsion Medical Systems SE, München, Deutschland

^b Ampuwa, Plastikampullen mit 10 ml Inhalt, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

^c isotone Kochsalzlösung 0,9% B. Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Abbildung III-6, A-E: Aufbringen und Befestigung der Devices auf dem Patienten

3.4 Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben

Sämtliche Blutprobenentnahmen erfolgten über den Messvenenkatheter in unbeschichtete Blutentnahmeröhrchen. Zu folgenden Zeitpunkten wurden jeweils 0,5 ml Blut entnommen und unverzüglich lichtgeschützt asserviert: vor ICG-Injektion (T_0) und je 1 Minute, 3, 6, 9, 18, 42, und 64 Minuten nach ICG-Injektion (T_1 - T_{64}). Bei Hund 1 und Hund 2 vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle von Hund 1 wurden zusätzlich Blutprobenentnahmen zu folgenden Zeitpunkten durchgeführt: 12, 30 und 52 Minuten nach ICG-Injektion.

Bei Bedarf wurde der Venenkatheter mit einer heparinisierten^a isotonen Natriumchloridlösung^b gespült. Bei der darauffolgenden Blutprobenentnahme wurden die ersten 0,3 ml Blut verworfen.

Die Blutproben wurden innerhalb von maximal vier Stunden nach Entnahme zentrifugiert (Landsman et al., 1976) und das Serum lichtgeschützt bei -80°C bis zum Probenversand aufbewahrt. Darüber hinaus wurde jeweils eine Probe der verwendeten ICG-Lösung lichtgeschützt bei -80°C asserviert. Die Proben von Hund 1 wurden im Anschluss an die zweite Messung bei der Dreimonatskontrolle auf Trockeneis zur Analyse versendet. Die Proben der restlichen Hunde wurden gesammelt nach Abschluss der letzten Messung, ebenfalls auf Trockeneis, versendet.

Die Bestimmung der Serum-ICG-Konzentration erfolgte fluorometrisch^c am Zentrum für Medizinische Forschung der medizinischen Fakultät Mannheim. Hierzu wurde die Fluoreszenz der Serumproben nach einer vordefinierten Verdünnung bei einer Exzitationswellenlänge von 760 nm und einer Emissionswellenlänge von 820 nm gemessen. Aus der asservierten ICG-Lösung und einer gepoolten Serumprobe (Restserum von Hunden, die kein ICG erhalten hatten und bei denen im Rahmen einer Vorstellung in der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Blutuntersuchung durchgeführt worden war) wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die mit derselben Methode analysiert wurde (Standardkurve). Für sämtliche Messungen wurde jeweils ein Doppelansatz durchgeführt.

4 Chirurgischer Verschluss des portosystemischen Shunts

Der Eingriff erfolgte in Allgemeinanästhesie. Diese wurde mit Atropin^d (0,02 mg/kg intravenös) prämediziert, mit Fentanyl^e (5 µg/kg intravenös) und Propofol^f (2-4 mg/kg nach Wirkung intravenös) eingeleitet und über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran^g (1-3 % inhalativ) und eine Fentanyl^e-Dauertropfinfusion (5 µg/kg/h intravenös) aufrechterhalten. Nach Laparotomie wurde eine intraoperative mesenteriale Portographie (Suter, 1975) zur Visualisierung von Shuntmorphologie und -lokalisation und zur Evaluierung der Lebergefäßentwicklung nach temporärem Verschluss des Shuntgefäßes durchgeführt. Es erfolgten Druckmessungen über

^a Heparin Natrium Braun 25.000 IE/ 5 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; 0,2 ml verdünnt mit 100 ml Natriumchloridlösung

^b Natriumchlorid-Trägerlösung Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

^c Tecan Infinite M 200 und i-control Microplate Reader Software, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz

^d Atropinsulfat B. Braun 0,5 mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

^e Fentanyl 50 µg/ml, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland

^f Vetofol 10 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

^g Isofluran CP, CP-Pharma HandelsGes. mbH, Burgdorf, Deutschland

ein wassergefülltes Steigrohrsystem bei offenem und digital verschlossenem PSS (Stosic, 2011).

Anschließend erfolgte ein chirurgischer Verschluss des Shuntgefäßes nach einer von zwei publizierten Methoden (Kapitel II3.7). Wenn die intraoperativen Druckmessungen sowie die optische Kontrolle (Darmmotilität und –verfärbung bei digitaler Shuntokklusion) einen sofortigen vollständigen Verschluss des PSS erlaubten, wurde das Shuntgefäß mit Seide ligiert (Hunt und Hughes, 1999; Hurn und Edwards, 2003; Broome et al., 2004; Vermote et al., 2007) und der vollständige Verschluss mittels intraoperativer mesenterialer Portographie bewiesen. Andernfalls wurde ein progressiver Verschluss mittels Cellophan Banding gewählt (Harari et al., 1990; Youmans und Hunt, 1998, 1998; Hunt et al., 2004; Frankel et al., 2006).

Zur postoperativen Überwachung wurden die Hunde zunächst auf die Intensivstation und im späteren Verlauf auf die Normalstation verbracht. Eine Woche nach der Operation wurden sie nach Hause entlassen.

5 Beurteilung des Verschlussgrades des ePSS

Bei den Hunden, die ein Cellophan Banding zum progressiven PSS-Verschluss erhalten hatten und bei denen dopplersonographisch bei der Dreimonatskontrolle kein Fluss über das Shuntgefäß nachweisbar war, wurde anschließend eine transabdominale Splenoportographie durchgeführt. Hierbei wurde in Allgemeinanästhesie (Diazepam^a 0,5 mg/kg intravenös, Levomethadon/Fenpipramid^b 0,5/0,026 mg/kg intravenös, Isofluran 1-3 % inhalativ) unter sonographischer Kontrolle transkutan die Milz punktiert und in das Milzparenchym oder eine Milzvene jodhaltiges Kontrastmittel^c (1 ml/kg, ungefähr 1:1 verdünnt mit isotoner Natriumchloridlösung^d) zügig von Hand injiziert (Suter, 1975). Unter Durchleuchtung wurde beurteilt, ob der PSS vollständig verschlossen war oder ein Restfluss über das Shuntgefäß vorlag. Die Auswertung erfolgte durch einen Diplomate des European College of Veterinary Internal Medicine, Companion Animal, Kardiologie (Dipl. ECVIM-CA (Cardiology)).

Bei sonographisch nachweisbarem Shuntfluss bei der Dreimonatskontrolle wurde auf eine Angiographie verzichtet. War intraoperativ eine Seidenligatur durchgeführt oder mittels Angiographie bereits der Nachweis eines vollständigen Shuntverschlusses erbracht worden, entfiel ebenfalls die Notwendigkeit einer Splenoportographie im Rahmen der Dreimonatskontrolle.

^a Diazepam-ratiopharm 10 mg/2 ml Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

^b L-Polamivet, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland

^c Xenetix 300, Guerbet GmbH, Sulzbach, Deutschland

^d Natriumchlorid-Trägerlösung Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

Es wurden folgende Kriterien für den Verschlussgrad des ePSS festlegt:

- Der ePSS galt als offen, wenn sonographisch oder angiographisch ein Fluss über den PSS nachweisbar war.
- Der ePSS galt als verschlossen, wenn
 - eine Seidenligatur durchgeführt worden war oder
 - ein Cellophan Banding durchgeführt worden war und mittels Angiographie (intraoperative mesenteriale Portographie oder transabdominale Splenoportographie bei der Dreimonatskontrolle) kein Fluss über den PSS nachweisbar war.

6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mit einem Tabellenkalkulationsprogramm^a und einer Statistiksoftware^b. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

6.1 Laboruntersuchungen

Vor der Analyse wurden die Daten der Laboruntersuchungen mittels D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test auf Normalverteilung untersucht. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde bei normalverteilten Proben der T-Test für gepaarte beziehungsweise ungepaarte Stichproben eingesetzt. Bei nichtnormalverteilten Proben wurde für gepaarte Stichproben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben und für ungepaarte Stichproben der Mann-Whitney-Test verwendet.

6.2 ICG-Elimination

6.2.1 *Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination*

Ein Flussdiagramm zur Veranschaulichung der im Folgenden beschriebenen, schrittweisen Aufbereitung der transkutan ermittelten Eliminationskurve findet sich in Abbildung III-7.

Mithilfe des Studienprotokolls (IX Anhang, Abbildung IX-2) und visueller Inspektion der Rohdaten wurden folgende Zeitpunkte und -intervalle festgelegt:

- T_{inj} : Injektionszeitpunkt
- BKG: Background, Intervall von 5 Minuten vor Injektion bis zum Injektionszeitpunkt
- T_1 : Zeitpunkt 1 Minute nach Injektion
- T_{15} : Zeitpunkt 15 Minuten nach Injektion
- T_{64} : Ende der Messung, Zeitpunkt 64 Minuten nach Injektion

^a Microsoft Excel 2010, Microsoft Corporation, Redmond, USA

^b GraphPad Prism 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

In die weitere Analyse gingen die Rohdaten von T_{inj} bis T_{64} ein. Von der Signalstärke wurde jeweils der Median des BKG subtrahiert (lineare Transformation). Anschließend wurden die Kurven zur besseren Vergleichbarkeit so normiert, dass die maximale Signalstärke auf der y-Achse 100 % und der mediane BKG 0 % entsprach. Es wurde jeweils der Mittelwert aus den normierten Daten der beiden Devices, die während einer Messung verwendet worden waren, gebildet. An die Mittelwerte von T_1 bis T_{15} wurde computergestützt eine monoexponentielle Kurve angepasst (Center et al., 1983). Hierzu wurde eine nichtlineare Regression nach Einkompartimentmodell (Methode der kleinsten Quadrate nach vorheriger automatischer Ausreißerelimination) verwendet. Das Plateau der ermittelten Kurve musste gleich 0 % sein, der Exponent durfte sowohl negative als auch positive Werte annehmen.

Die transkutan gemessene Halbwertszeit (HWZ_{tk}), extrapolierte Signalstärke zum Zeitpunkt T_{inj} ($Y_{0\ tk}$), fraktionelle Extraktion (k_{tk}), das 95%-Konfidenzintervall der vorher genannten Messgrößen sowie der Determinationskoeffizient (R^2_{tk}) wurden von der Statistiksoftware ausgegeben. Die transkutan gemessene Plasmaverschwinderate (PDR_{tk}) und 15-Minuten-Retentionsrate ($R15_{tk}$) wurden folgendermaßen berechnet:

$$PDR_{tk}(\%/Min) = k_{tk} \times 100$$

$$R15_{tk}(\%) = \frac{Y_{15\ Min\ tk}}{Y_{0\ tk}} \times 100 = \frac{Y_{0\ tk} \times e^{-k_{tk} \times 15}}{Y_{0\ tk}} \times 100$$

Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede bei HWZ_{tk} , PDR_{tk} , und $R15_{tk}$ wurden dieselben statistischen Verfahren wie für die Laboruntersuchungen angewandt (Kapitel 6.1).

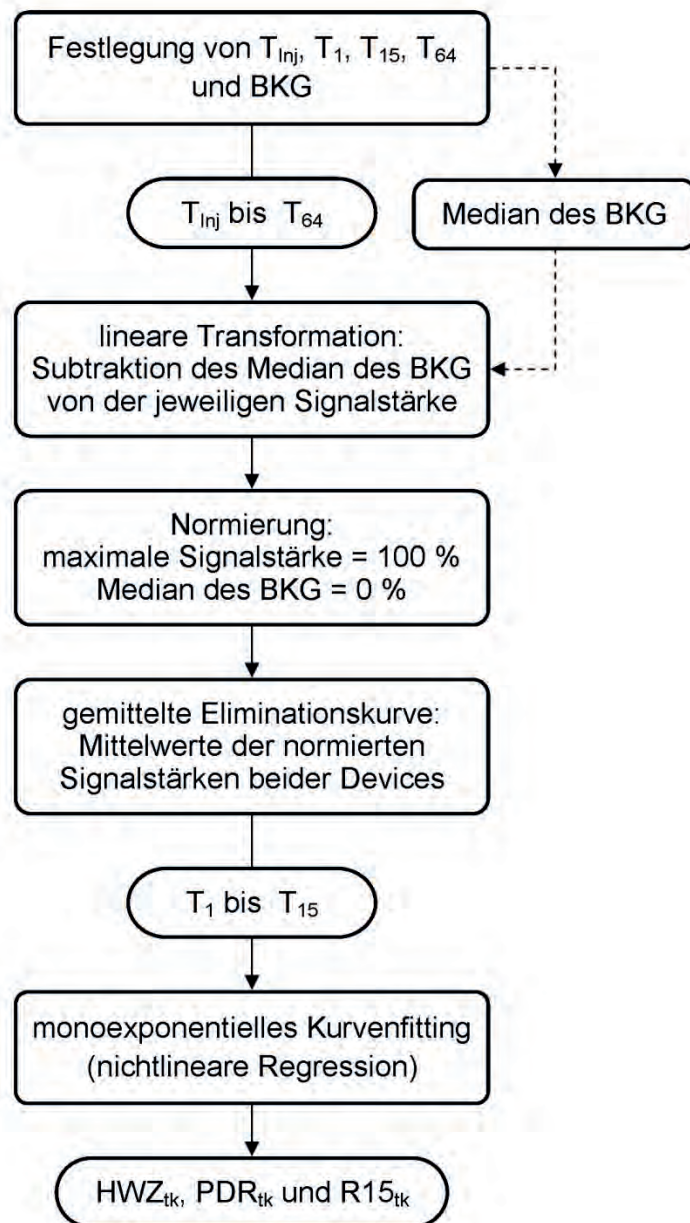
Abbildung III-7: Flussdiagramm zur Aufbereitung der transkutan fluorometrisch ermittelten ICG-Eliminationskurve

T_{inj} : Injektionszeitpunkt, $T_{1/15/64}$: Zeitpunkt 1/15/64 Minuten nach ICG-Injektion,

BKG: Background (Intervall von 5 Minuten vor Injektion bis T_{inj}),

HWZ_{tk} : transkutan ermittelte Halbwertszeit, PDR_{tk} : transkutan ermittelte Plasmaverschwinderate,

$R15_{tk}$: transkutan ermittelte 15-Minuten-Retentionsrate



6.2.2 Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben

Die Standardkurven wurden mittels linearer Regression (Methode der kleinsten Quadrate) angepasst, um die Linearität zwischen Fluoreszenz und Serum-ICG-Konzentration zu bestätigen.

Die vordefinierten Zeitpunkte und –intervalle wurde von der transkutanen Messung übernommen (Kapitel 6.2.1). Traten Abweichungen zwischen dem geplanten und dem tatsächlichen Zeitpunkt der Blutprobenentnahme auf, so ging der tatsächliche Zeitpunkt nach ICG-Injektion in die Berechnungen ein (IX Anhang, Abbildung IX-2).

Die ermittelte Fluoreszenz der Serum-ICG-Elimination wurde einer linearen Transformation unterzogen. Hierzu wurde von der Fluoreszenzstärke zu den Messzeitpunkten T_1 bis T_{64} der Mittelwert der Fluoreszenz zum Zeitpunkt T_0 subtrahiert. Anschließend wurde der Mittelwert der beiden Messungen an einem Zeitpunkt bestimmt und die Kurven so normiert, dass die maximale Fluoreszenzstärke auf der y-Achse 100 % und der Mittelwert zum Zeitpunkt T_0 0 % entsprach. An den Zeitraum eine bis 15 Minuten nach ICG-Injektion ($T_1, T_3, T_6, T_9, T_{12}$) wurde computergestützt eine monoexponentielle Kurve angepasst (Center et al., 1983). Hierzu wurde eine nichtlineare Regression (Methode der kleinsten Quadrate) durchgeführt.

Die Halbwertszeit der Serum-ICG-Elimination (HWZ_{Se}), extrapolierte Fluoreszenz zum Zeitpunkt T_{inj} ($Y_{0\ Se}$) fraktionelle Extraktion (k_{Se}), das 95%-Konfidenzintervall der vorher genannten Messgrößen sowie der Determinationskoeffizient (R^2_{Se}) wurden von der Statistiksoftware ausgegeben. Die Plasmaverschwinderate PDR_{Se} und 15-Minuten-Retentionsrate $R_{15\ Se}$ wurden folgendermaßen berechnet:

$$PDR_{Se}(\%/Min) = k_{Se} \times 100$$

$$R_{15\ Se}(\%) = \frac{Y_{15\ Min\ Se}}{Y_{0\ Se}} \times 100 = \frac{Y_{0\ se} \times e^{-k_{Se} \times 15\ Min}}{Y_{0\ se}} \times 100$$

Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede bei HWZ_{Se} , PDR_{Se} und $R_{15\ Se}$ wurden dieselben statistischen Verfahren wie für die Laboruntersuchungen angewandt (Kapitel 6.1).

6.2.3 Vergleich von invasiver und transkutaner Messmethode

Der Zusammenhang zwischen HWZ_{tk} und HWZ_{Se} , zwischen PDR_{tk} und PDR_{Se} sowie zwischen $R_{15\ tk}$ und $R_{15\ Se}$ wurde mittels linearer Regression (Methode der kleinsten Quadrate) untersucht. Die Beurteilung erfolgt anhand des zugehörigen Determinationskoeffizienten R^2 . Es wurde außerdem der p-Wertes der Nullhypothese (Steigung der ermittelten Geraden entspricht Null) durch das Statistikprogramm ermittelt.

IV Ergebnisse

1 Patientengut

Es wurden zehn Hunde in die prospektive Studie eingeschlossen. In der nachfolgenden Tabelle IV-1 sind das Signalement der Patienten zum Zeitpunkt der Voruntersuchungen vor dem Eingriff und in Tabelle IV-2 Shuntmorphologie, chirurgische Verschlussmethode sowie Verschlussgrad bei der Dreimonatskontrolle zusammengestellt.

Es nahmen sechs Hündinnen und vier Rüden teil. Die Rassen Mops und Dackel waren jeweils zweimal vertreten, außerdem ein reinrassiger Yorkshire Terrier und ein Yorkshire Terrier-Mischling. Bis auf einen Mischlingsrüden von 76,4 Monaten und 18,8 kg Körpergewicht handelte es sich um junge und kleine Hunde mit einem Körpergewicht von weniger als 10 kg und einem Alter von weniger als zwei Jahren. Bei dem oben genannten Mischlingsrüden (Hund 7) war der ePSS bereits im Welpenalter diagnostiziert worden. Er stand seitdem unter konservativer diätetischer Therapie.

Entsprechend der Dopplersonographie und Angiographie lag bei der Hälfte der Patienten ein splenocavaler Shunt (auch linker Magenvenenshunt), bei drei Patienten ein Portophrenicoshunt und bei zwei Patienten ein Portoazygosshunt vor. Bei vier Hunden (40 %) wurde eine Seidenligatur durchgeführt, bei den anderen sechs Hunden (60 %) ein Cellophan Banding. Ein vollständiger Verschluss des ePSS zum Zeitpunkt der Dreimonatskontrolle wurde bei 6/9 Hunden (66,7 %) erzielt, darunter drei Hunde mit Seidenligatur. Dementsprechend war der PSS bei 3/6 Hunden (50 %) mit Cellophan Banding zum Zeitpunkt der Dreimonatskontrolle bereits verschlossen. Drei Hunde wiesen weiterhin einen Restshunt auf, sodass der Shunt als offen klassifiziert wurde (33,3 %). Ein Hund verstarb postoperativ.

Keiner der untersuchten Hunde wies klinische oder echokardiographische Hinweise auf eine klinisch relevante Herzerkrankung mit verminderter Herzauswurfleistung oder auf eine Hypovolämie auf.

Tabelle IV-1: Signalement der Patienten vor Eingriff

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter [Monate]	Körpergewicht [kg]
1	Parson Russel Terrier	weiblich	11,4	7,2
2	Yorkshire Terrier-Mischling	männlich	10,6	5,9
3	Mops	weiblich	13,4	5,6
4	Mischling	weiblich	16,1	3,3
5	Yorkshire Terrier	männlich	22,6	3,3
6	Dackel	weiblich	5,8	5,4
7	Mischling	männlich-kastriert	76,4	18,8
8	Zwergpudel	männlich	12,8	4,6
9	Mops	weiblich	8,9	4,8
10	Dackel	weiblich	11,1	4,3
Median			12,1	5,1
Mittelwert			18,9	6,3

Tabelle IV-2: Shuntmorphologie, OP-Methode und Zustand bei Dreimonatskontrolle

Nr.	Shuntform	OP-Methode	Zustand bei Dreimonatskontrolle
1	splenocaval (linker Magenvenenshunt)	Seidenligatur	verschlossen
2	portophrenico (aus Milzvene)	Cellophan Banding	verschlossen
3	portoazygos (aus Milzvene)	Cellophan Banding	verschlossen
4	splenocaval (linker Magenvenenshunt)	Cellophan Banding	offen
5	splenocaval (linker Magenvenenshunt)	Cellophan Banding	verschlossen
6	splenocaval (linker Magenvenenshunt)	Cellophan Banding	offen
7	splenocaval (linker Magenvenenshunt)	Cellophan Banding	offen
8	portophrenico (aus Gastroduodenalvene)	Seidenligatur	verschlossen
9	portoazygos (aus Milzvene)	Seidenligatur	verschlossen
10	portophrenico (aus Milzvene)	Seidenligatur	verstorben

2 Laboruntersuchungen

Im Folgenden sind die Resultate der Laboruntersuchungen vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle aufgeführt. Da Hund 10 nach dem Eingriff verstarb, liegen hier keine Daten zur Dreimonatskontrolle vor.

2.1 Hämatologische Parameter

Die Befunde der hämatologischen Untersuchung (Hkt, RBC, CHr, MCV) vor dem Eingriff und im Rahmen der Dreimonatskontrolle sind nachfolgend in Tabelle IV-3 und Tabelle IV-4 aufgeführt. Abweichungen vom Referenzbereich sind gekennzeichnet (↓: Erniedrigung, ↑: Erhöhung). Eine graphische Darstellung über den Verlauf der hämatologischen Parameter findet sich in Abbildung IV-1.

Vor Eingriff lag der CHr bei 9/9 (100 %) und der MCV bei 9/10 Hunden (90 %) unterhalb des Referenzbereiches. Mittels T-Test für gepaarte Stichproben war ein signifikanter Anstieg des CHr nachweisbar ($p=0,0096$). Der Unterschied bezüglich des MCV war nicht signifikant ($p=0,1628$). Bei Hund 9 wurde vor Eingriff der CHr nicht bestimmt.

Keiner der untersuchten Hunde wies zu den beiden Zeitpunkten eine erniedrigte Erythrozytenzahl auf und bei lediglich 2/10 Hunden war der Hämatokrit vor dem Eingriff erniedrigt. Dennoch war ein signifikanter Anstieg des Hämatokrits bei der Dreimonatskontrolle nachweisbar ($p=0,0349$).

Hinsichtlich des Verschlussgrad des ePSS zeigte sich in 12/12 Messungen (100 %) bei offenem PSS und in 0/6 Messungen (0 %) mit verschlossenem PSS ein erniedrigter CHr. Bei 12/13 Messungen (92 %) mit offenem PSS und bei 0/6 Messungen (0 %) mit verschlossenem PSS war ein erniedrigtes MCV nachweisbar. Der Unterschied war für beide Parameter signifikant (CHr: $p<0,0001$; MCV: $p=0,0013$).

Tabelle IV-3: Hämatologische Parameter vor Eingriff

k. A.: keine Angabe, Mittel: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes

Nr. Patient	Hkt (39-56) [%]	RBC (5,5-8,5) [10 ³ /l]	MCV (62,61-73,5) [fl]	CHr (1,43-1,71) [pg]
1	38 ↓	7,84	48,8 ↓	1,03 ↓
2	46	7,69	60,0 ↓	1,41 ↓
3	41	6,90	58,9 ↓	1,34 ↓
4	47	7,33	64,6	1,34 ↓
5	44	7,28	59,8 ↓	1,33 ↓
6	33 ↓	6,58	50,7 ↓	1,03 ↓
7	51	9,07 ↑	55,7 ↓	1,28 ↓
8	41	7,44	54,9 ↓	1,26 ↓
9	44	7,09	61,6 ↓	k. A.
10	51	8,31	60,8 ↓	1,38 ↓
Median	44	7,39	59,4	1,33
Mittel ± SD	43,6 ± 5,6	7,56 ± 0,72	57,6 ± 5,0	1,27 ± 0,14
95% CI	39,6-47,6	7,04-8,07	54,0-61,1	1,16-1,38

Tabelle IV-4: Hämatologische Parameter bei der Dreimonatskontrolle

*: vollständiger Verschluss des ePSS bei der Dreimonatskontrolle, Mittel: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes

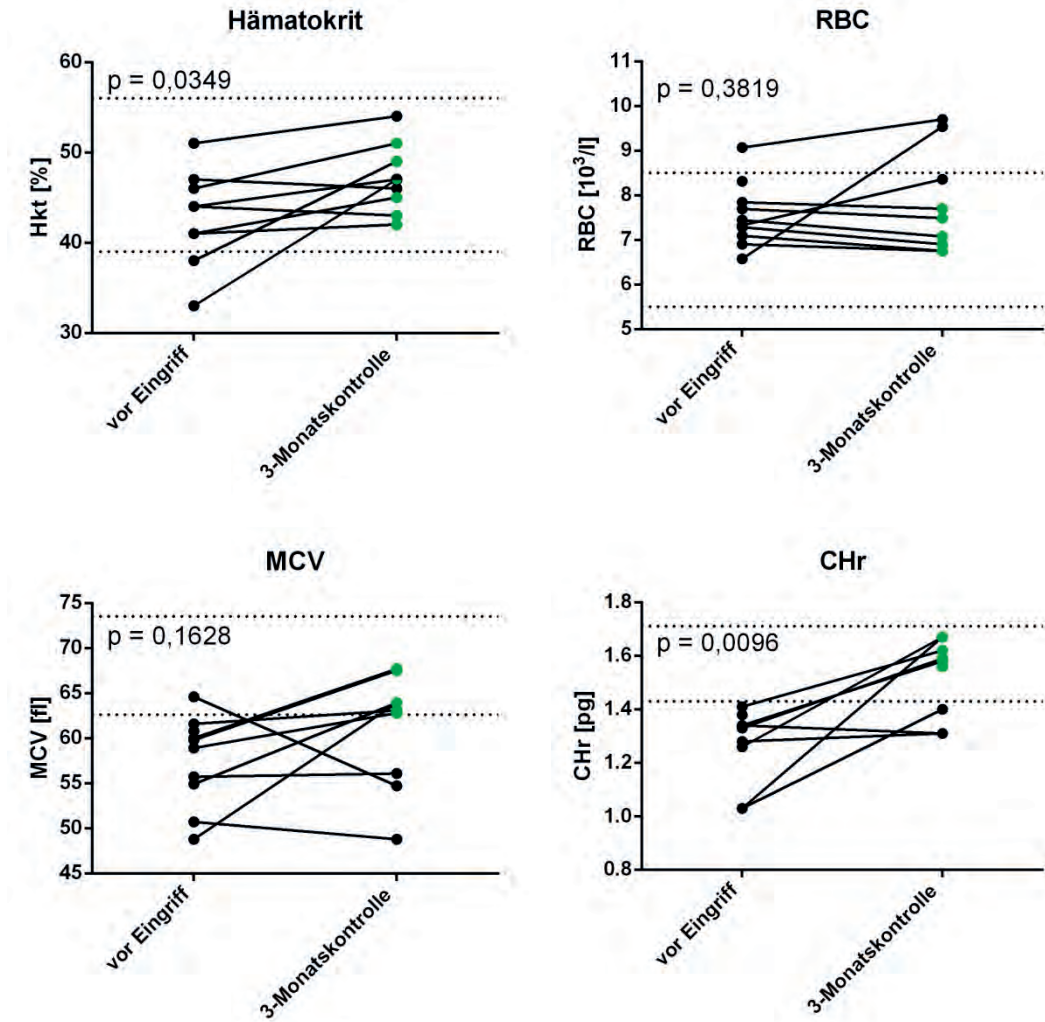
Nr. Patient	Hkt (39-56) [%]	RBC (5,5-8,5) [10 ³ /l]	MCV (62,61-73,5) [fl]	CHr (1,43-1,71) [pg]
1*	49	7,7	63,9	1,67
2*	51	7,49	67,7	1,62
3*	42	6,75	62,8	1,58
4	46	8,36	54,7 ↓	1,31 ↓
5*	47	6,9	67,5	1,59
6	47	9,54 ↑	48,8 ↓	1,40 ↓
7	54	9,7	56,1 ↓	1,31 ↓
8*	45	7,08	63,9	1,67
9*	43	6,75	63,1	1,56
Median	47	7,49	63,1	1,58
Mittel ± SD	47,1 ± 3,8	7,8 ± 1,15	60,9 ± 6,4	1,52 ± 1,44
95% CI	44,2-50,0	6,92-8,69	56,1-65,8	1,41-1,64

Abbildung IV-1: Hämatologische Parameter im Verlauf

schwarz: PSS offen, grün: PSS verschlossen

Die gestrichelten Linien entsprechen den Grenzen des Referenzbereiches.

Stichproben normalverteilt, p-Werte mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt



2.2 Blutchemische Parameter

Die Befunde der blutchemischen Untersuchung (Urea, Alb, Glu, Chol) vor dem Eingriff und im Rahmen der Dreimonatskontrolle sind nachfolgend in Tabelle IV-5 und Tabelle IV-6 aufgeführt. Eine graphische Darstellung des Verlaufs der blutchemischen Parameter findet sich in Abbildung IV-2.

Vor Eingriff zeigten 9/10 Hunde (90 %) eine Erniedrigung der Plasmaharnstoffkonzentration und 10/10 (100 %) eine Hypoalbuminämie. Bezüglich der Plasmaalbumin-, -harnstoff- und -cholesterinkonzentration war ein signifikanter Anstieg bei der Dreimonatskontrolle nachweisbar, wobei insbesondere der Anstieg der Plasmaalbuminkonzentration hochsignifikant war ($p=0,0001$). Hinsichtlich der Plasmaglukosekonzentration war weder ein klinisch relevanter noch signifikanter Unterschied nachweisbar. Keiner der Patienten zeigte zu einem der beiden Zeitpunkte eine Hypoglykämie.

Hinsichtlich des Verschlussgrad des ePSS zeigten sich in 12/13 Messungen (92 %) mit offenem PSS und 0/6 Messungen (0 %) mit verschlossenem PSS eine Hypoalbuminämie und eine erniedrigte Plasmaharnstoffkonzentration. Für alle vier Parameter war die Plasmakonzentration bei Vorliegen eines ePSS signifikant niedriger (Urea: $p=0,0233$; Alb: $p=0,0002$; Glu: $p=0,0370$; Chol: $p=0,0022$). Der Unterschied bezüglich der Plasmaglukosekonzentration war jedoch nicht klinisch relevant.

Bei den Hunden 3, 4 und 10 vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle von Hund 7 lag eine leichtgradige Hyperbilirubinämie vor ($3,8 \mu\text{mol/l}$, $8,42 \mu\text{mol/l}$, $3,97 \mu\text{mol/l}$ und $5,26 \mu\text{mol/l}$; Referenzbereich $<3,6 \mu\text{mol/l}$). Diese war in allen Fällen deutlich unterhalb der als Ausschlusskriterium festgelegten Grenze von $51,3 \mu\text{mol/l}$ (entspricht 3 mg/dl), ab der eine Einschränkung der ICG-Elimination gegeben ist (Center et al., 1983).

Tabelle IV-5: Blutchemische Parameter vor dem Eingriff

Mittel: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes

Nr. Patient	Urea (3,3-9,82) [mmol/l]	Alb (29,6-37,01) [g/l]	Glu (3,3-6,53) [mmol/l]	Chol (3,3-8,6) [mmol/l]
1	2,29 ↓	28,5 ↓	4,48	2,71 ↓
2	3,07 ↓	28,0 ↓	6,17	2,72 ↓
3	1,73 ↓	25,8 ↓	4,96	2,60 ↓
4	2,20 ↓	21,5 ↓	4,02	2,30 ↓
5	3,64	29,1 ↓	6,83 ↑	3,70
6	1,90 ↓	25,1 ↓	5,64	2,50 ↓
7	2,62 ↓	24,5 ↓	5,66	5,90
8	1,43 ↓	21,4 ↓	6,64 ↑	3,90
9	2,05 ↓	26,8 ↓	5,34	2,40 ↓
10	2,44 ↓	26,4 ↓	4,86	3,80
Median	2,25	26,1	5,49	2,72
Mittel ± SD	2,34 ± 0,65	25,7 ± 2,7	5,46 ± 0,91	3,25 ± 1,11
95% CI	1,87-2,80	23,8-27,6	4,81-6,11	2,46-4,05

Tabelle IV-6: Blutchemische Parameter bei der Dreimonatskontrolle

*: vollständiger Verschluss des ePSS bei der Dreimonatskontrolle, Mittel: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes

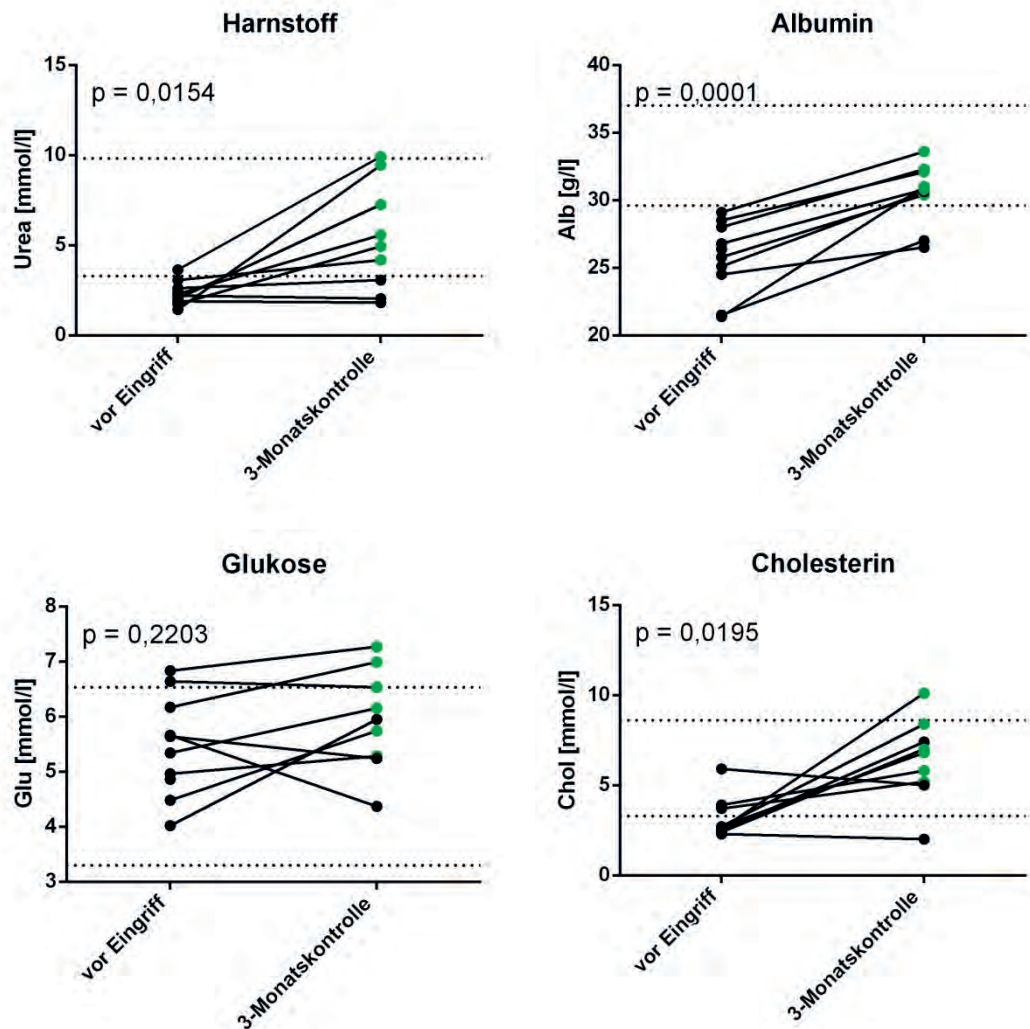
Nr. Patient	Urea (3,3-9,82) [mmol/l]	Alb (29,6-37,01) [g/l]	Glu (3,3-6,53) [mmol/l]	Chol (3,3-8,6) [mmol/l]
1*	5,57	32,1	5,74	6,80
2*	4,18	32,3	6,99 ↑	8,40
3*	4,94	30,4	5,28	10,10 ↑
4	2,04 ↓	27,0 ↓	5,95	2,00 ↓
5*	9,92 ↑	33,6	7,27 ↑	5,20
6	1,82 ↓	30,6	5,24	7,40
7	3,07 ↓	26,5 ↓	4,37	5,00
8*	9,44 ↑	31,0	6,53	5,80
9*	7,25	30,8	6,15	7,00
Median	4,94	30,8	5,95	6,80
Mittel ± SD	5,36 ± 2,99	30,5 ± 2,3	5,95 ± 0,91	6,41 ± 2,3
95% CI	3,06-7,66	28,7-32,3	5,24-6,65	4,64-8,18

Abbildung IV-2: Blutchemische Parameter im Verlauf

schwarz: PSS offen, grün: PSS verschlossen

Die gestrichelten Linien entsprechen den Grenzen des Referenzbereiches.

Stichproben für Urea, Alb und Glu normalverteilt, p-Werte mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt; Stichproben für Chol nicht normalverteilt, p-Wert mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben ermittelt



2.3 Gallensäurenstimulationstest und Ammoniaktoleranztest

Die Befunde der dynamischen Leberfunktionstest GST und ATT vor dem Eingriff und im Rahmen der Dreimonatskontrolle sind nachfolgend in Tabelle IV-7 und in Tabelle IV-8 aufgeführt. Eine graphische Darstellung des Verlaufs der basalen Werte GS-0 und NH₃-0 findet sich in Abbildung IV-3. Bei drei Hunden lag vor Eingriff lediglich die präprandiale Serumgallensäurenkonzentration vor. Aufgrund des erhöhten präprandialen Wertes wurde der GST in diesen Fällen als positiv gewertet.

Vor Eingriff wiesen 10/10 Hunde (100 %) eine Erhöhung der präprandialen Serumgallensäurenkonzentration und 6/10 Hunde (60 %) eine erhöhte basale Blutammoniakkonzentration auf. Hinsichtlich NH₃-0 war ein signifikanter Abfall bei der Dreimonatskontrolle nachweisbar ($p=0,0273$). Bei allen Hunden waren vor Eingriff GST und ATT positiv.

Hinsichtlich des Verschlussgrad des ePSS lagen für GS-0 und für NH₃-0 signifikant höhere Werte bei offenem PSS vor (GS-0: $p=0,0004$; NH₃-0: $p=0,0043$). Alle Hunde mit PSS konnten mittels GST oder ATT identifiziert werden. Lediglich bei Hund 3 war der ATT falsch positiv trotz vollständigem Shuntverschluss.

Tabelle IV-7: GST und ATT vor dem Eingriff

k. A.: keine Angabe, Mittel: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes

Nr. Patient	GS-0 (<20) [μmol/l]	GS-2 (<35) [μmol/l]	NH ₃ -0 (<60) [μmol/l]	NH ₃ -30 (<60) [μmol/l]	NH ₃ -45 (<60) [μmol/l]
1	192 ↑	k. A.	37	high ↑	high ↑
2	124 ↑	k. A.	130 ↑	-	-
3	120 ↑	146 ↑	57	164 ↑	199 ↑
4	60 ↑	89 ↑	201 ↑	-	-
5	221 ↑	206 ↑	131 ↑	-	-
6	158 ↑	232 ↑	134 ↑	-	-
7	343 ↑	204 ↑	101 ↑	-	-
8	116 ↑	269 ↑	225 ↑	-	-
9	219 ↑	216 ↑	36	168 ↑	201 ↑
10	276 ↑	k. A.	31	58	151 ↑
Median	175		115,5		
Mittel ± SD	182,9 ± 84,8		108,3 ± 69,0		
95% CI	122,2-243,6		59,0-157,6		

Tabelle IV-8: GST und ATT bei der Dreimonatskontrolle

*: vollständiger Verschluss des ePSS bei der Dreimonatskontrolle, Mittel: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes

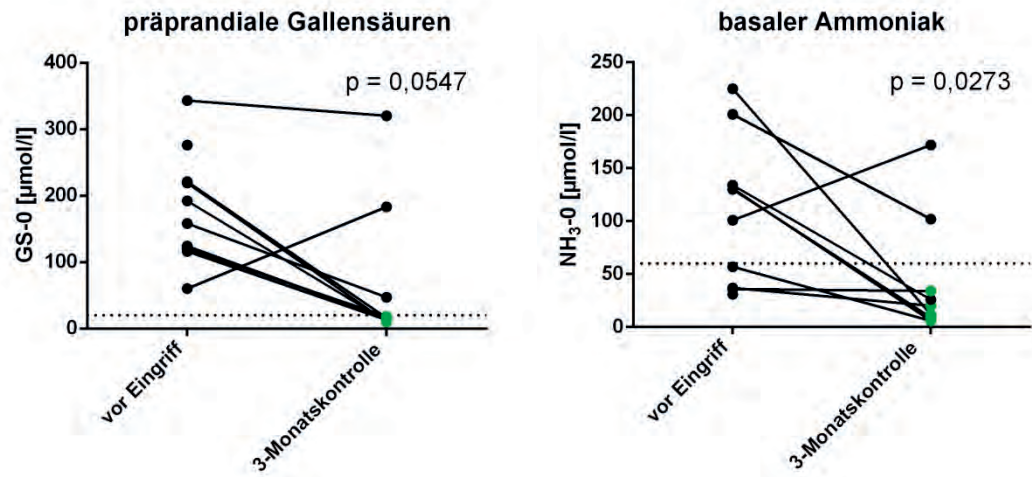
Nr. Patient	GS-0 (<20) [μmol/l]	GS-2 (<35) [μmol/l]	NH ₃ -0 (<60) [μmol/l]	NH ₃ -30 (<60) [μmol/l]	NH ₃ -45 (<60) [μmol/l]
1*	11	11	20	22	11
2*	15	9	9	11	32
3*	18	13	low	7	77 ↑
4	183 ↑	133 ↑	102 ↑	-	-
5*	16	12	low	low	low
6	47 ↑	93 ↑	26	69 ↑	146 ↑
7	320 ↑	310 ↑	172 ↑	-	-
8*	13	10	12	53	47
9*	10	16	34	13	11
Median	16		20		
Mittel ± SD	70,3 ± 108,8		43 ± 56,9		
95% CI	-13,3-154,0		-0,7-86,7		

Abbildung IV-3: präprandiale Gallensäuren und basaler Ammoniak im Verlauf

schwarz: PSS offen, grün: PSS verschlossen

Die gestrichelten Linien entsprechen den Grenzen des Referenzbereiches.

Stichproben nicht normalverteilt, p-Werte mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben ermittelt



3 ICG-Elimination

3.1 Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination

3.1.1 *Ablauf der Messung*

Das Aufbringen der Devices und der Zeitraum der transkutanen Messung verliefen bei allen Tieren unauffällig. Die Methode erwies sich als einfach praktikabel. Einige der Hunde zeigten eine geringgradige Bewegungseinschränkung durch den Schulterverband. Es wurden keine adversen Reaktionen auf die Injektion des ICG beobachtet. Ebenso traten keine Hautreaktionen an der seitlichen Thoraxwand, an der die Devices aufgebracht worden waren, auf.

Die computergestützte Auslesung der Rohdaten unmittelbar nach Abnehmen der Devices gestaltete sich komplikationslos und nahm weniger als eine Minute in Anspruch. Alle Datenreihen waren vollständig.

3.1.2 *Kurvenverlauf*

Die graphische Darstellung der Rohdaten ist exemplarisch in Abbildung IV-4 dargestellt. Alle Rohdatenkurven zeigten einen horizontalen Verlauf im Rahmen der Backgroundmessung gefolgt von einem scharf begrenzten Peak zum Injektionszeitpunkt. Unter Berücksichtigung des Studienprotokolls gelang die optische Identifikation von T_{inj} und der davon abgeleiteten Zeitpunkte komplikationslos.

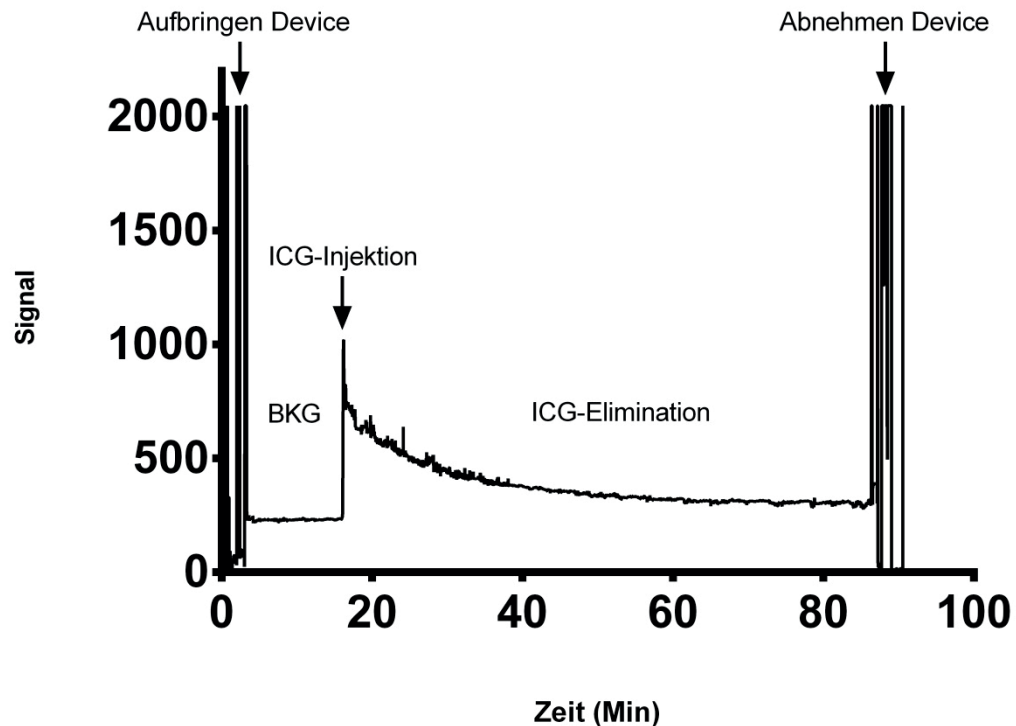
Die Bearbeitung der ICG-Eliminationskurve von T_{inj} bis T_{64} erfolgte mittels y-Achsenverschiebung auf die Höhe des Backgroundes (lineare Transformation), Normierung und Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) (Kapitel III, Abbildung III-7). Die schrittweise Aufbereitung der Eliminationskurve ist beispielhaft an Hund 1 (verschlossener PSS bei der Dreimonatskontrolle) in Abbildung IV-5 und an Hund 6 (offener PSS bei der Dreimonatskontrolle) in Abbildung IV-6 aufgezeigt. Die Eliminationskurven der restlichen Hunde finden sich im Anhang (Abbildung IX-3 bis Abbildung IX-10).

Durch lineare Transformation und Normierung wurde eine gute Vergleichbarkeit der beiden Kurven einer Messung erzielt. In den meisten Fällen waren die Kurven anschließend nahezu deckungsgleich.

Bei einigen Hunden war ein plötzlicher Sprung der Eliminationskurve über einen bestimmten Zeitabschnitt (ähnlich einer Y-Achsenverschiebung) nachweisbar. Dieser Kurvensprung trat in der Regel bei beiden Messreihen einer Messung in gegenläufiger Richtung auf (z. B. Hund 2 vor Eingriff und bei Dreimonatskontrolle, Hund 4 vor Eingriff, Hund 8 vor Eingriff). Durch Bildung des Mittelwertes beider Messreihen wurde eine optische Glättung der Eliminationskurve erzielt.

Abbildung IV-4: graphische Darstellung der Rohdaten der transkutan gemessenen ICG-Elimination

Hund 1 bei 3-Monatskontrolle, Device Nr. 1; BKG: Background



Mit einer Ausnahme war bei allen Messungen ein Abfall der Eliminationskurve sichtbar. Hund 9 zeigte vor Eingriff in beiden Messreihen eine ansteigende Eliminationskurve. Die restlichen Hunde wiesen vor dem Eingriff einen langsamen, annähernd konstanten Abfall der gemittelten Eliminationskurve auf. Bei der Dreimonatskontrolle hatten alle Hunde mit verschlossenem PSS einen schnelleren Abfall der gemittelten Eliminationskurve als vor Eingriff (Hunde 1, 2, 5, 8 und 9). Sie fiel initial zügig exponentiell und später langsamer ab. Die Ausnahme bildete Hund 3, bei dem die gemittelten Eliminationskurven vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle optisch vergleichbar waren, obwohl der PSS komplett verschlossen war. Bei allen Hunden mit offenem PSS bei der Dreimonatskontrolle verlief die gemittelte Eliminationkurve ebenfalls ähnlich der vor dem Eingriff.

Keine der gemittelten Eliminationskurven erreichte innerhalb des Messintervalls von 64 Minuten wieder das Niveau des Backgrounds. Zwar wurde bei den Hunden 1, 2, 5 und 8 bei der Dreimonatskontrolle die Kurve zunehmend flacher und verlief im letzten Drittel fast parallel zur x-Achse, lag jedoch weiterhin oberhalb des Medianwertes des Backgrounds.

Bei semilogarithmischer Darstellung verliefen die gemittelten Eliminationskurven von T_1 bis T_{15} annähernd linear, sodass ein monoexponentielles Kurvenfitting in diesem Zeitintervall angewandt wurde. Bei den Hunden mit offenem PSS blieb dieser lineare

Verlauf tendentiell über den gesamten Messzeitraum erhalten (monoexponentiell), während Hunde mit verschlossenem PSS im Anschluss eher ein Abknicken der Kurve mit darauf folgender, verlangsamer Eliminationskinetik aufwiesen (biexponentiell). Besonders gut ließ sich dies bei Hund 5 nachvollziehen, wie in Abbildung IV-7 sichtbar.

Eine graphische Darstellung des monoexponentiellen Fittings findet sich exemplarisch für die Hunde 1 und 6 in Abbildung IV-8 und Abbildung IV-9, und für die restlichen Hunde im Anhang in Abbildung IX-11.

3.1.3 HWZ_{tk} , PDR_{tk} und $R15_{tk}$

Aus der nichtlinearen Regression ergaben sich für jede Messung direkt HWZ_{tk} , Y_{0tk} und k_{tk} . PDR_{tk} und $R15_{tk}$ wurden wie vorgängig beschrieben berechnet. Zur weiteren Auswertung wurden HWZ_{tk} , PDR_{tk} und $R15_{tk}$ herangezogen. Sie sind in Tabelle IV-9 zusammengestellt. Eine graphische Übersicht über die Entwicklung der einzelnen Parameter im Verlauf findet sich in Abbildung IV-10.

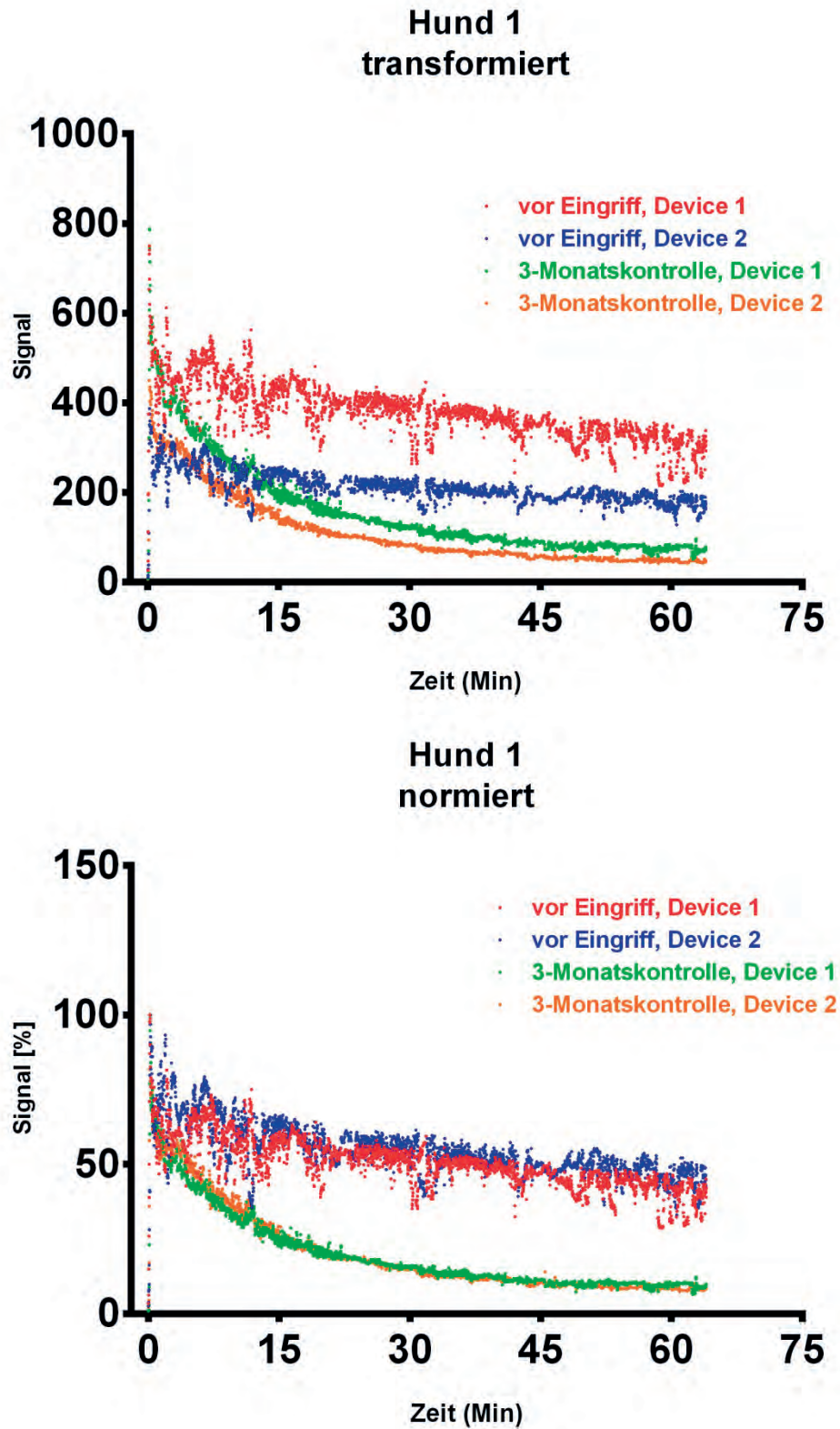
Entsprechend des ansteigenden Charakters der gemittelten Eliminationskurve von Hund 9 vor Eingriff lagen hier eine negative HWZ_{tk} und PDR_{tk} und eine $R15_{tk}$ über 100 % vor.

Die PDR_{tk} stieg bei der Dreimonatskontrolle signifikant gegenüber der Messung vor Eingriff an ($p=0,0171$), während $R15_{tk}$ signifikant absank ($p=0,0209$). Bezüglich der HWZ_{tk} war kein signifikanter Unterschied nachweisbar, obwohl die deutliche Differenz der Medianwerte mit 59,1 Minuten (vor Eingriff) und 16,4 Minuten (Dreimonatskontrolle) dies suggerierte.

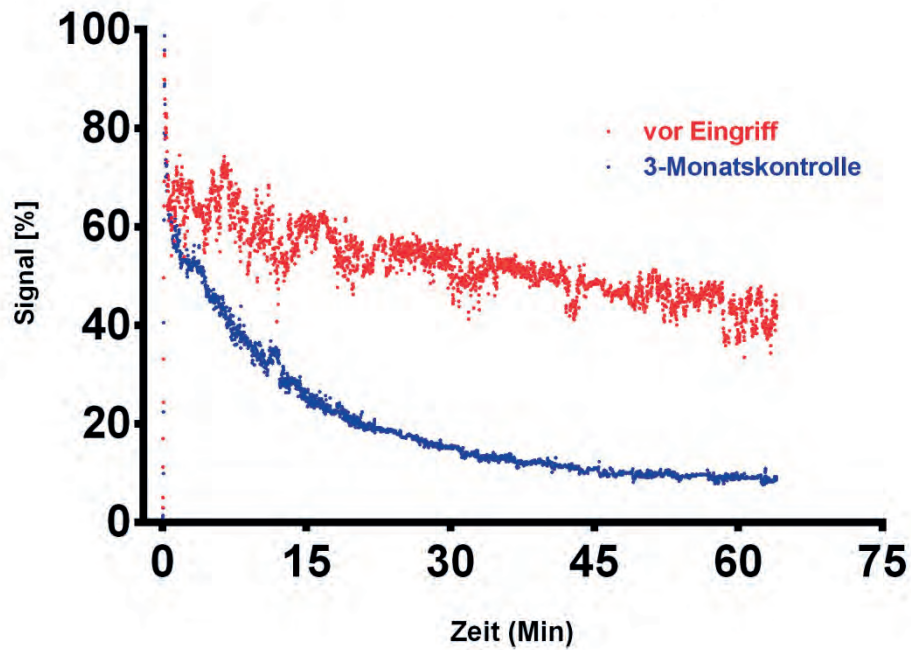
Bei ungepaarter Analyse der Datensätze hinsichtlich des Verschlussgrades des ePSS zeigte sich analog dazu ein hochsignifikanter Unterschied in der PDR_{tk} ($p<0,0001$) und der $R15_{tk}$ ($p<0,0001$), nicht aber in der HWZ_{tk} ($p=0,2323$). Eine Übersicht über die p-Werte der Parameter der transkutanen und der invasiven Messmethode findet sich in Tabelle IV-11. Für PDR_{tk} und $R15_{tk}$ bestand, mit Ausnahme von Hund 3 bei der Dreimonatskontrolle (verschlossener PSS), keine Überlappung zwischen Hunden mit offenem und verschlossenem PSS:

- offener PSS:
 - $PDR_{tk} \leq 2,6 \text{ %/Min}$
 - $R15_{tk} \geq 67,5 \text{ %}$
- verschlossener PSS:
 - $PDR_{tk} \geq 4,1 \text{ %/Min}$
 - $R15_{tk} \leq 53,9 \text{ %}$

Abbildung IV-5: Hund 1 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve
lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 1
gemittelte Eliminationskurve



Hund 1
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

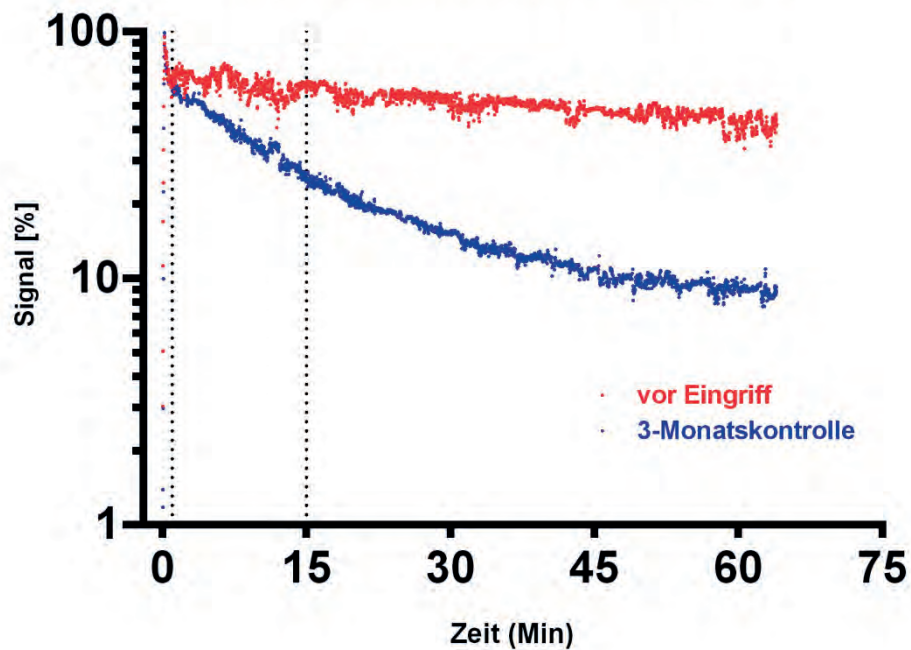
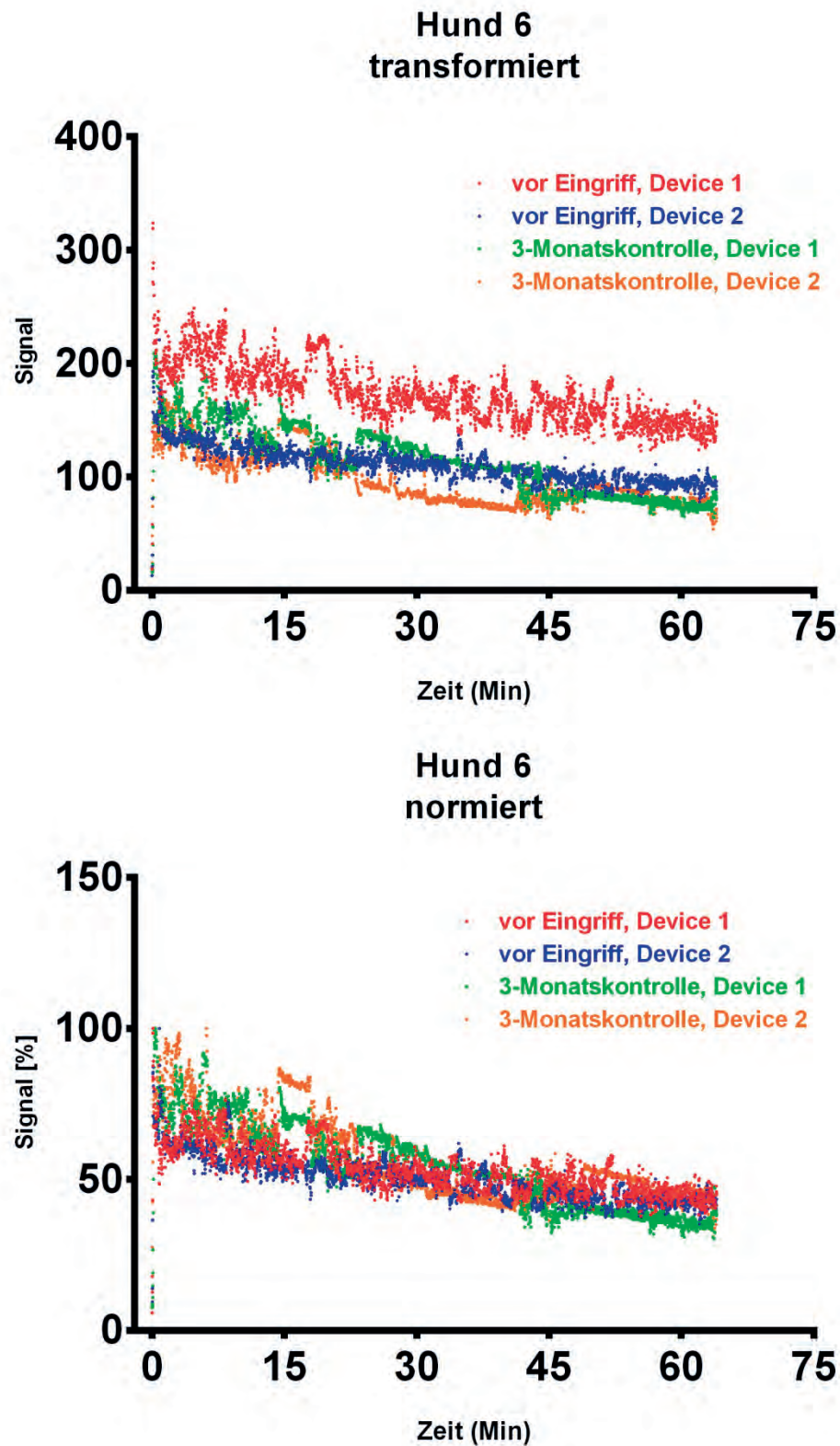
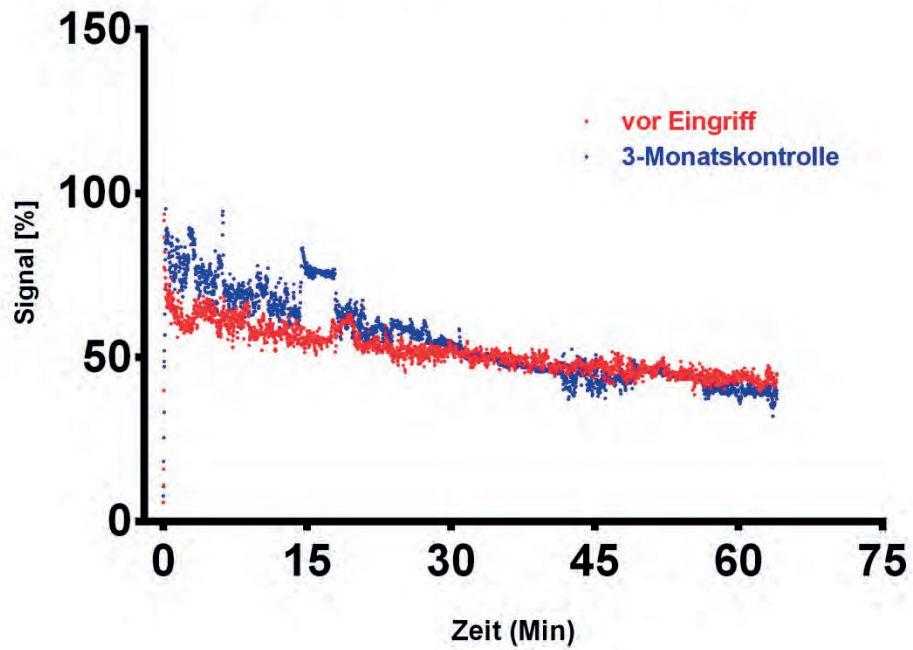


Abbildung IV-6: Hund 6 (offener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 6
gemittelte Eliminationskurve



Hund 6
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

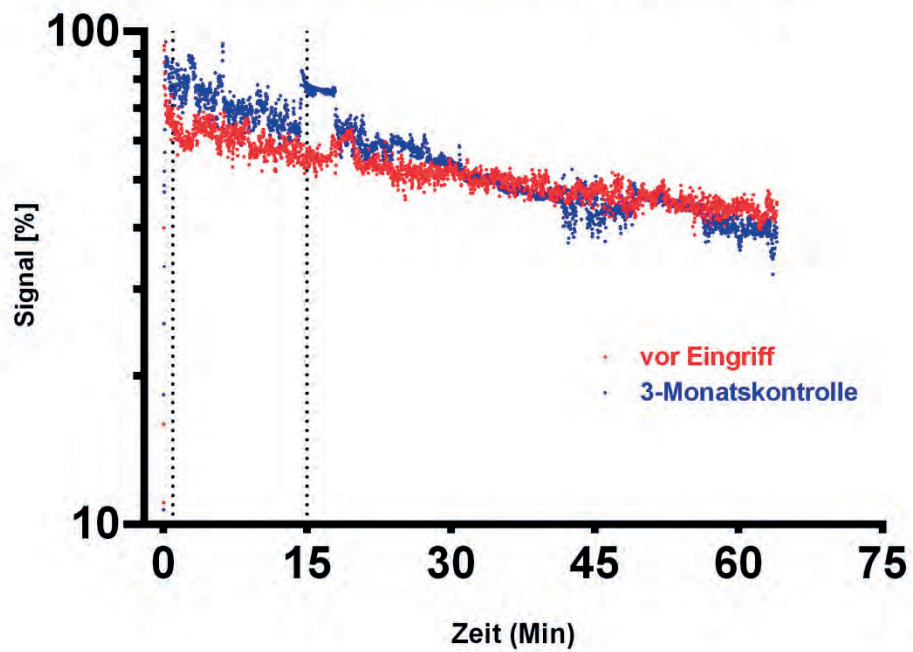


Abbildung IV-7: Hund 5 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), semilogarithmische Darstellung der ICG-Elimination

gemittelte Eliminationskurve nach linearer Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung und Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen

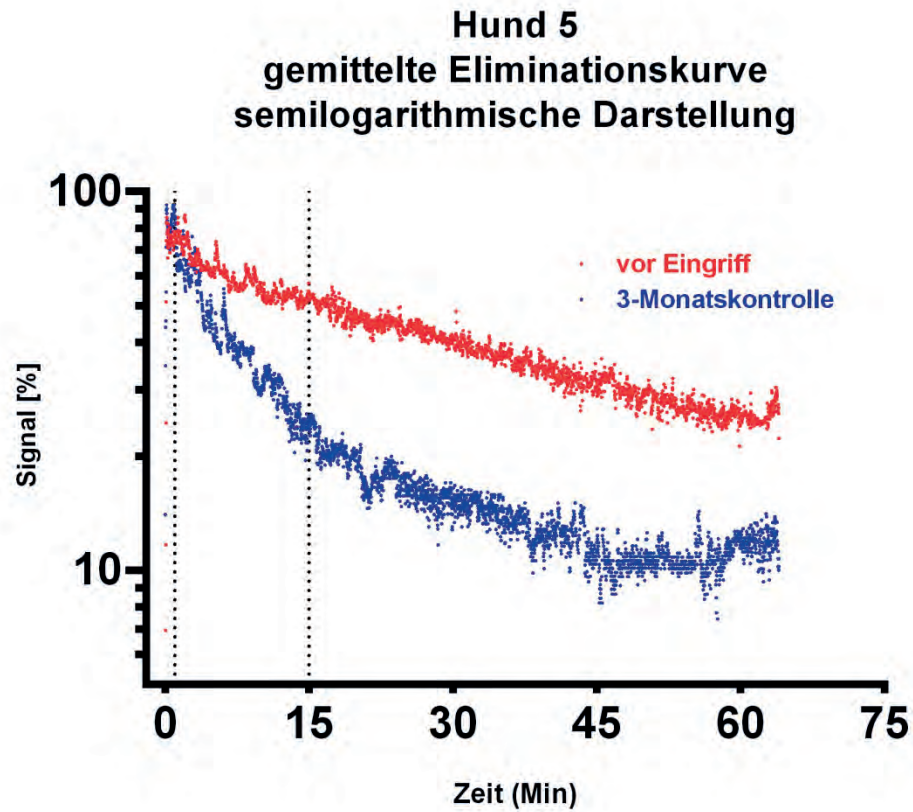


Abbildung IV-8: Hund 1 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), graphische Darstellung der nichtlinearen Regression

monoexponentielles Fitting der transkutan gemessenen, gemittelten ICG-Eliminationskurve von 1-15 Minuten nach ICG-Injektion unter Angabe des Determinationskoeffizientes R^2_{tk}

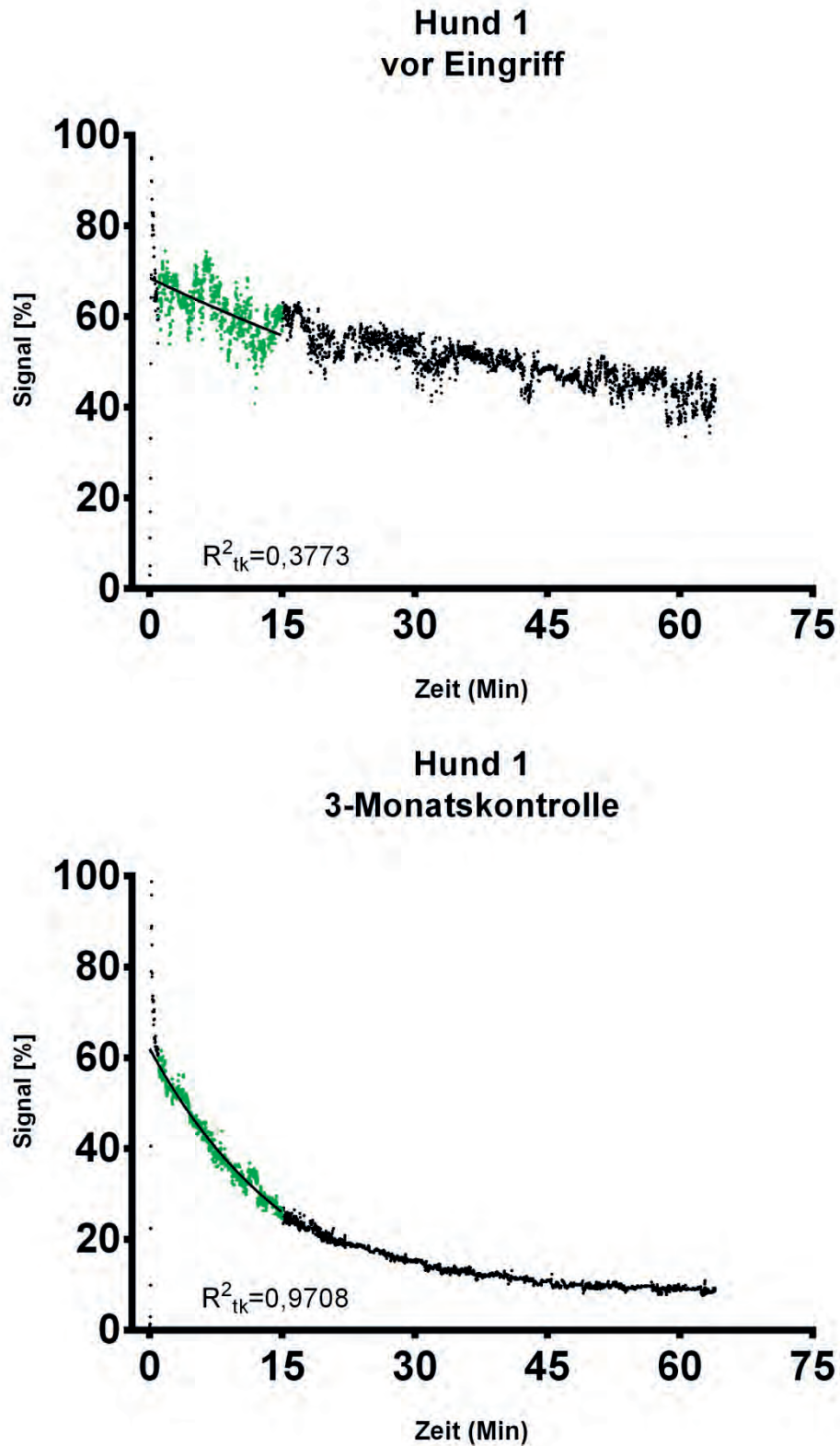


Abbildung IV-9: Hund 6 (offener PSS bei Dreimonatskontrolle), graphische Darstellung der nichtlinearen Regression

monoexponentielles Fitting der transkutan gemessenen, gemittelten ICG-Eliminationskurve von 1-15 Minuten nach ICG-Injektion unter Angabe des Determinationskoeffizienten R^2_{tk} ,
rot: Ausreißer

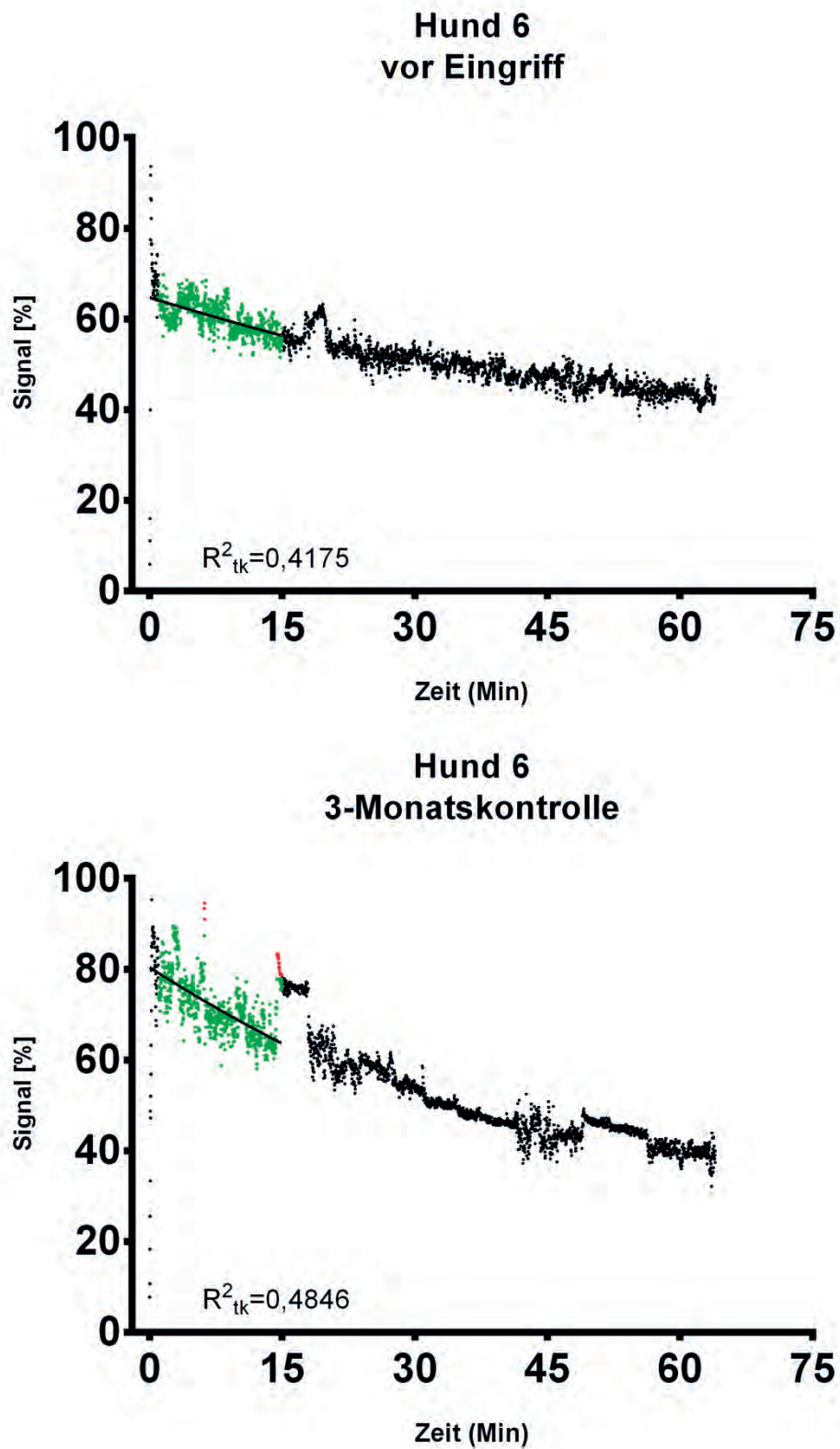


Tabelle IV-9: Transkutan gemessene Halbwertszeit (HWZ_{tk}), Plasmaverschwinderate (PDR_{tk}) und 15-Minuten-Retentionsrate (R15_{tk}) vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle

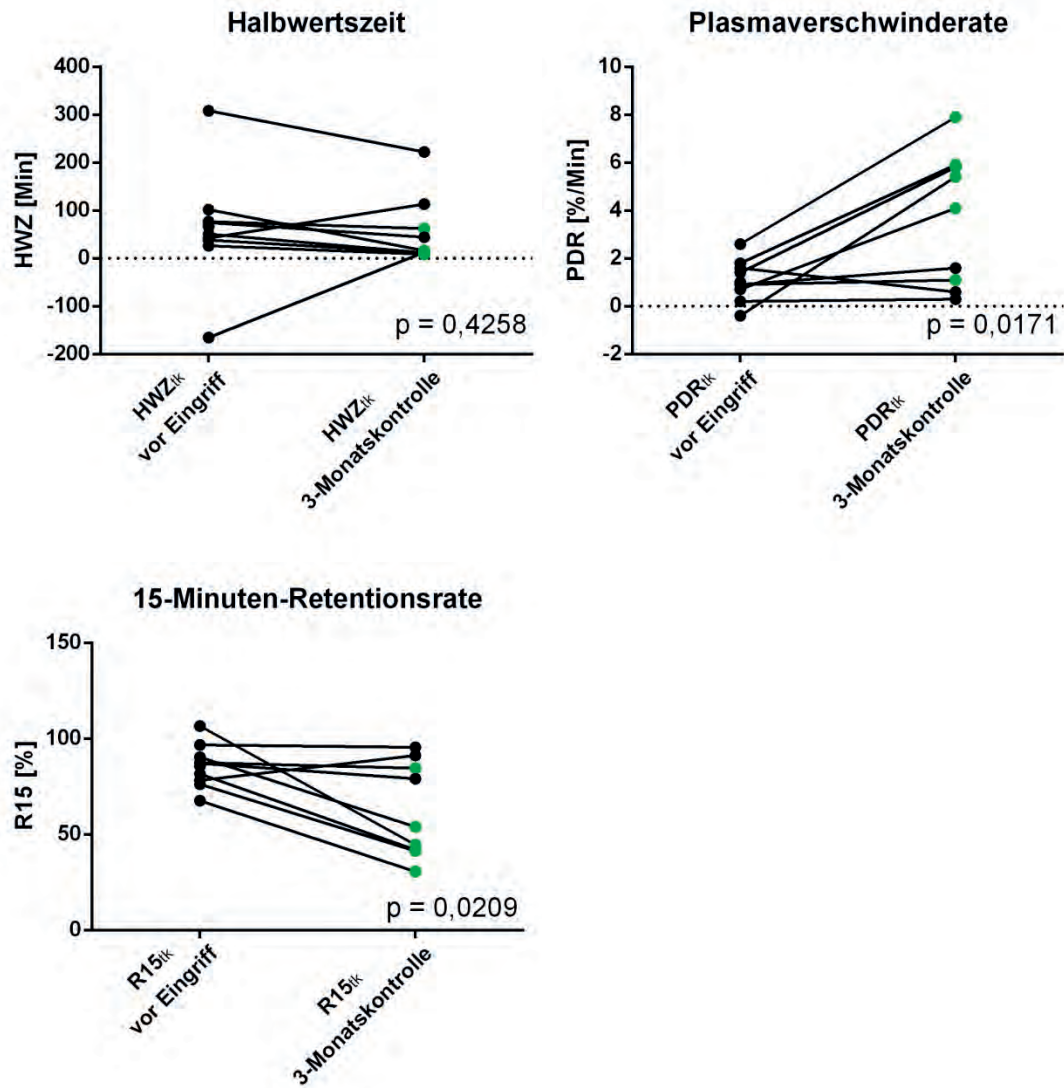
*: vollständiger Verschluss des ePSS bei der Dreimonatskontrolle, k. A.: keine Angabe, SD: Standardabweichung

Nr. Patient	vor Eingriff			3-Monatskontrolle		
	HWZ _{tk} [Min]	PDR _{tk} [%/Min]	R15 _{tk} [%]	HWZ _{tk} [Min]	PDR _{tk} [%/Min]	R15 _{tk} [%]
1*	50,9	1,4	81,5	12,0	5,8	41,9
2*	38,3	1,8	76,2	11,8	5,9	41,3
3*	77,0	0,9	87,4	62,2	1,1	84,6
4	42,4	1,6	78,2	113,0	0,6	91,2
5*	26,5	2,6	67,5	8,8	7,9	30,6
6	74,8	0,9	87,0	44,4	1,6	79,1
7	308,4	0,2	96,7	222,0	0,3	95,4
8*	101,7	0,7	90,3	16,4	4,1	53,9
9*	-165,4	-0,4	106,5	12,9	5,4	44,5
10	67,3	1,0	85,7	k. A.	k. A.	k. A.
Median	59,1	1,0	86,3	16,4	4,1	53,9
Mittelwert ± SD	62,2 ± 113,9	1,1 ± 0,8	85,7 ± 10,9	55,9 ± 71,2	3,6 ± 2,8	62,5 ± 24,9

Abbildung IV-10: Halbwertszeit (HWZ_{tk}), Plasmaverschwinderate (PDR_{tk}) und 15-Minuten-Retentionsrate ($R15_{tk}$) der transkutan gemessenen ICG-Elimination im Verlauf

schwarz: PSS offen, grün: PSS verschlossen

Stichproben für PDR_{tk} und $R15_{tk}$ normalverteilt, p-Werte mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt; Stichproben für HWZ_{tk} nicht normalverteilt, p-Wert mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben ermittelt



3.2 Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben

3.2.1 Ablauf der Messung

Die Blutprobenentnahmen über den Messvenenkatheter waren bei allen Hunden gut möglich. Bei einigen Hunden nahm die Blutprobengewinnung allerdings mehr als eine Minute in Anspruch, sodass sich der geplante Zeitpunkt der Blutprobenentnahme verzögerte. Der Endpunkt der Blutprobenentnahme wurde jeweils als Referenz genommen und entsprechend im Studienprotokoll notiert.

3.2.2 Standardkurve

Die Standardkurven aller Messungen zeigten in einem Konzentrationsbereich von 0 mg ICG/ml Serum bis 0,0025 mg ICG/ml einen linearen Verlauf mit einem Determinationskoeffizienten $R^2 > 0,99$. Alle gemessenen Fluoreszenzstärken der Serum-ICG-Eliminationskurven lagen innerhalb dieses Bereiches. Somit war ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und ICG-Serumkonzentration im relevanten Bereich gegeben.

3.2.3 Kurvenverlauf der Serum-ICG-Elimination

Die Serum-ICG-Eliminationskurven von Hund 1 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle) und Hund 6 (offener PSS bei Dreimonatskontrolle) sind exemplarisch in Abbildung IV-11 dargestellt. Die Eliminationskurven der restlichen Hunde befinden sich im Anhang in Abbildung IX-12.

Im Gegensatz zur transkutanen fluorometrischen Messmethode zeigten alle Eliminationskurven tendentiell einen Abfall der Serum-ICG-Konzentration über den gesamten Messzeitraum bis 64 Minuten nach ICG-Injektion. Die Eliminationskurven der Hunde 1, 2, 5 und 8 kehrten innerhalb dieses Zeitraumes bei der Dreimonatskontrolle auf das Ausgangsniveau vor ICG-Injektion (Background) zurück, die restlichen Kurven blieben darüber.

Optisch entsprachen alle Eliminationskurven außer denen von Hund 7 einer Exponentialfunktion. Hund 7 hingegen wies sowohl vor Eingriff als auch bei der Dreimonatskontrolle eher einen linearen Abfall über den Messzeitraum auf.

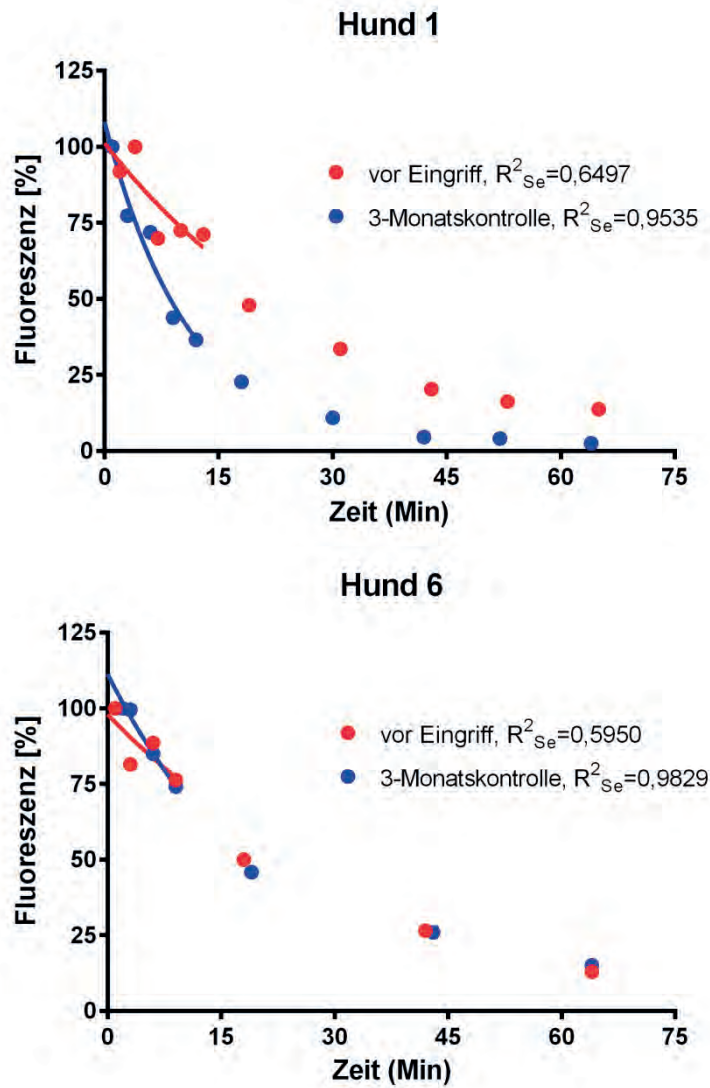
Bei Hund 3 war, wie auch bei der transkutanen Messmethode, trotz vollständig verschlossenem PSS bei der Dreimonatskontrolle keine beschleunigte Serum-ICG-Elimination im Vergleich zur Untersuchung vor Eingriff nachweisbar. Der Abfall der Serumkurve verlief sogar langsamer. Bei Hund 2 und Hund 9, deren PSS zum Zeitpunkt der Dreimonatskontrolle verschlossen waren, war der Verlauf der Eliminationskurven zu den beiden Messzeitpunkten optisch vergleichbar. Hund 1 und Hund 5 wiesen eine deutlich beschleunigte Serum-ICG-Elimination bei der Dreimonatskontrolle auf.

Die Hunde 4, 6 und 7, deren PSS bei der Dreimonatskontrolle offen war, zeigten einen vergleichbaren Kurvenverlauf vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle, ähnlich wie Hund 3.

Analog zur beschriebenen Methode (Center et al., 1983) gingen, wie auch bei der Evaluation der transkutanen fluorometrischen Bestimmung der ICG-Elimination, in die weiteren Berechnungen die Messpunkte von T_1 bis T_{15} ein. Die angenäherte Kurve aus dem monoexponentiellen Fitting mit dazugehörigem Determinationskoeffizienten R^2_{Se} ist in Abbildung IV-11 (Hund 1 und Hund 6) und im Anhang in Abbildung IX-12 (restliche Hunde) eingezeichnet.

Bei Hund 7 vor Eingriff und im Rahmen der Dreimonatskontrolle sowie bei Hund 8 vor Eingriff war kein eindeutiger Verlauf der Serum-ICG-Konzentration von T_1 bis T_{15} nachvollziehbar, sondern eher eine zufällige Streuung der Messpunkte. Es wurde zwar ein monoexponentielles Fitting durchgeführt, jedoch betrug $R^2_{Se} < 0,05$. Die angenäherte Kurve zeigte bei Hund 7 bei der Dreimonatskontrolle und bei Hund 8 vor Eingriff einen ansteigenden Verlauf. Im späteren zeitlichen Verlauf war hingegen ein Abwärtstrend der ICG-Elimination zu verzeichnen. Bei allen Messungen, bei denen dieses Phänomen auftrat, bestand eine eingeschränkte Leberfunktion durch den PSS.

Abbildung IV-11: Hund 1 (PSS verschlossen bei Dreimonatskontrolle) und Hund 6 (PSS offen bei Dreimonatskontrolle), Serum-ICG-Elimination
nach linearer Transformation, Bildung des Mittelwertes aus dem Doppelansatz und Normierung, Kurve des monoexponentiellen Fittings von T_1 bis T_{15} eingezeichnet unter Angabe des Determinationskoeffizienten R^2_{Se}



3.2.4 HWZ_{Se} , PDR_{Se} und $R15_{Se}$

Aus der nichtlinearen Regression von T_1 bis T_{15} ergaben sich jeweils HWZ_{Se} , Y_{0Se} und k_{Se} . In Abhängigkeit davon wurden PDR_{Se} und $R15_{Se}$ berechnet. Zur weiteren Auswertung wurden HWZ_{Se} , PDR_{Se} und $R15_{Se}$ herangezogen. Sie sind in Tabelle IV-10 zusammengestellt. Eine graphische Übersicht über die Entwicklung der einzelnen Parameter im Verlauf findet sich in Abbildung IV-12.

Analog zum ansteigenden Verlauf der angenäherten Kurve lagen bei Hund 7 bei der Dreimonatskontrolle und bei Hund 8 vor Eingriff HWZ_{Se} und PDR_{Se} im negativen Bereich und $R15_{Se}$ über 100 %.

Die Mittel- und Medianwerte der HWZ_{Se} und der $R15_{Se}$ sanken erwartungsgemäß bei der Dreimonatskontrolle im Vergleich zu den Werten vor Eingriff ab, während die PDR_{Se} anstieg. Es war jedoch für keinen der drei Parameter ein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Bei ungepaarter Analyse der Datensätze hinsichtlich Verschlussgrad des ePSS zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der PDR_{Se} ($p=0,0095$) und der $R15_{Se}$ ($p=0,0323$), nicht aber in der HWZ_{Se} ($p=0,2001$). Eine Übersicht über die p-Werte der Parameter der transkutanen und der invasiven Messmethode findet sich in Tabelle IV-11.

Tabelle IV-10: Invasiv gemessene Halbwertszeit (HWZ_{Se}), Plasmaverschwinderate (PDR_{Se}) und 15-Minuten-Retentionsrate (R15_{Se}) vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle

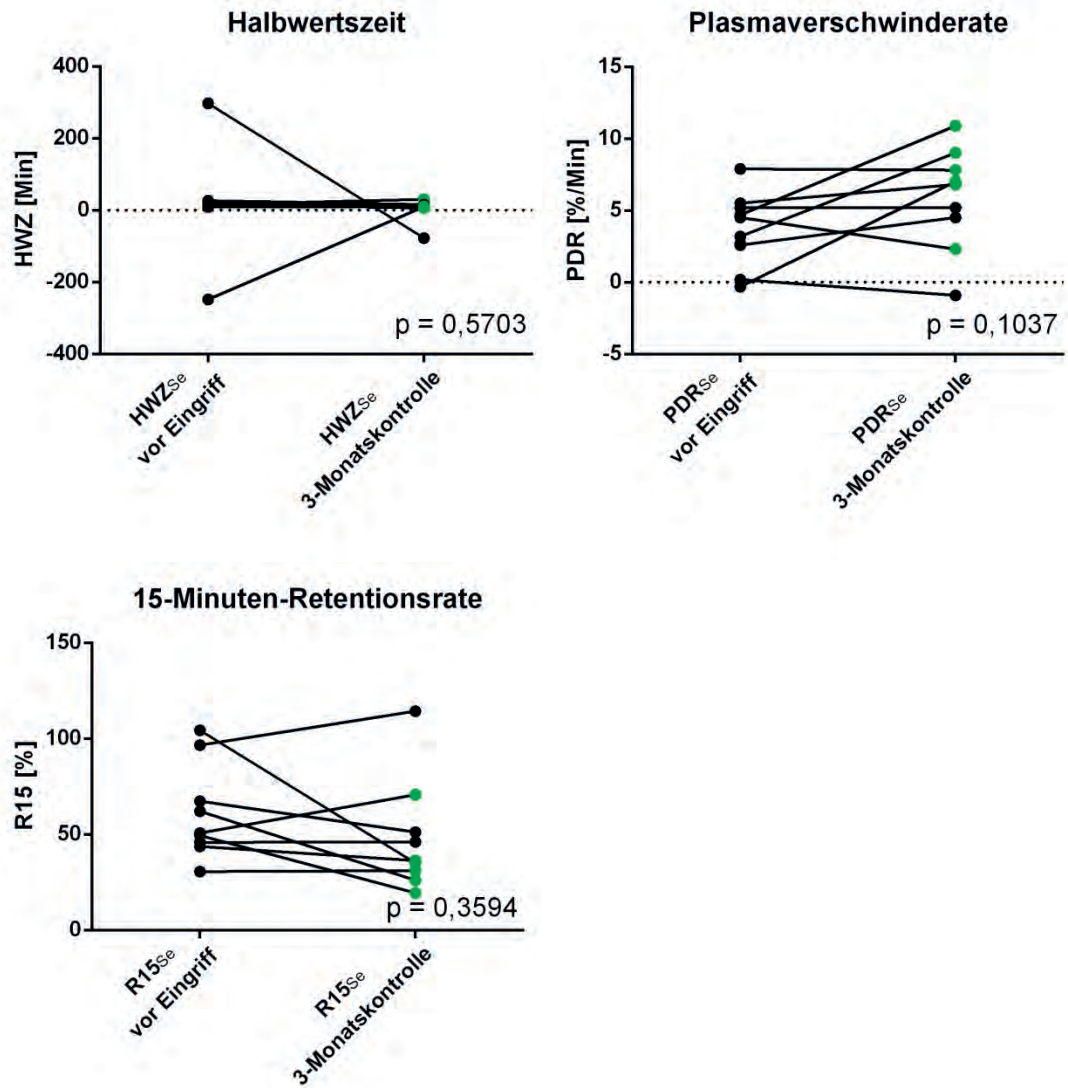
*: vollständiger Verschluss des ePSS bei der Dreimonatskontrolle, SD: Standardabweichung, k. A.: keine Angabe

Nr. Patient	vor Eingriff			3-Monatskontrolle		
	HWZ _{Se} [Min]	PDR _{Se} [%/Min]	R15 _{Se} [%]	HWZ _{Se} [Min]	PDR _{Se} [%/Min]	R15 _{Se} [%]
1*	21,8	3,2	62,0	7,7	9,0	26,1
2*	8,8	7,9	30,6	8,8	7,8	31,0
3*	15,3	4,5	50,7	30,0	2,3	70,7
4	13,3	5,2	45,8	13,4	5,2	46,0
5*	14,7	4,7	49,4	6,3	10,9	19,4
6	26,2	2,6	67,3	15,5	4,5	51,2
7	296,7	0,2	96,6	-77,8	-0,9	114,3
8*	-248,2	-0,3	104,3	9,9	7,0	35,1
9*	12,6	5,5	43,7	10,3	6,8	36,3
10	25,9	2,7	66,9	k. A.	k. A.	k. A.
Median	15,0	3,9	56,4	9,9	6,8	36,3
Mittelwert ± SD	18,7 ± 128,6	3,6 ± 2,5	61,7 ± 23,4	2,7 ± 31,0	5,8 ± 3,6	47,8 ± 29,2

Abbildung IV-12: Halbwertszeit (HWZ_{Se}), Plasmaverschwinderate (PDR_{Se}) und 15-Minuten-Retentionsrate ($R15_{Se}$) der Serum-ICG-Elimination im Verlauf

schwarz: PSS offen, grün: PSS verschlossen

Stichproben für HWZ_{Se} und $R15_{Se}$ nicht normalverteilt, p-Wert mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben ermittelt, Stichproben für PDR_{Se} normalverteilt, p-Werte mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt



3.3 Vergleich von invasiver und transkutaner Messmethode

Die Korrelation zwischen transkutaner fluorometrischer Messung der ICG-Elimination und invasiver Messung der Serum-ICG-Elimination wurde anhand der drei Parameter HWZ, PDR und R15 mittels linearer Regression untersucht. Die graphische Übersicht unter Angabe des jeweiligen Determinationskoeffizienten R^2 und des p-Wertes findet sich in Abbildung IV-13.

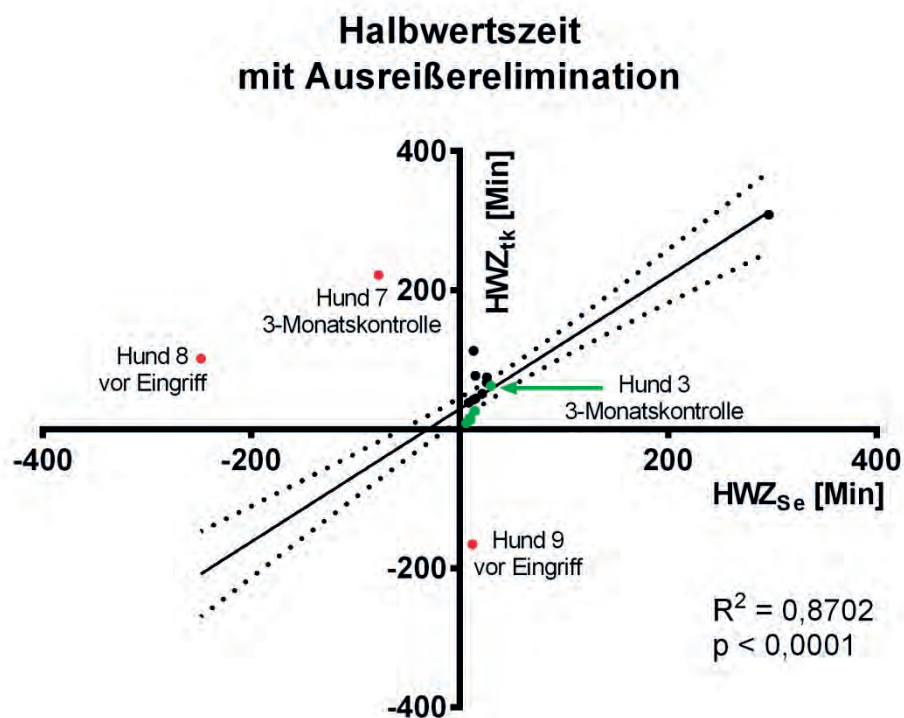
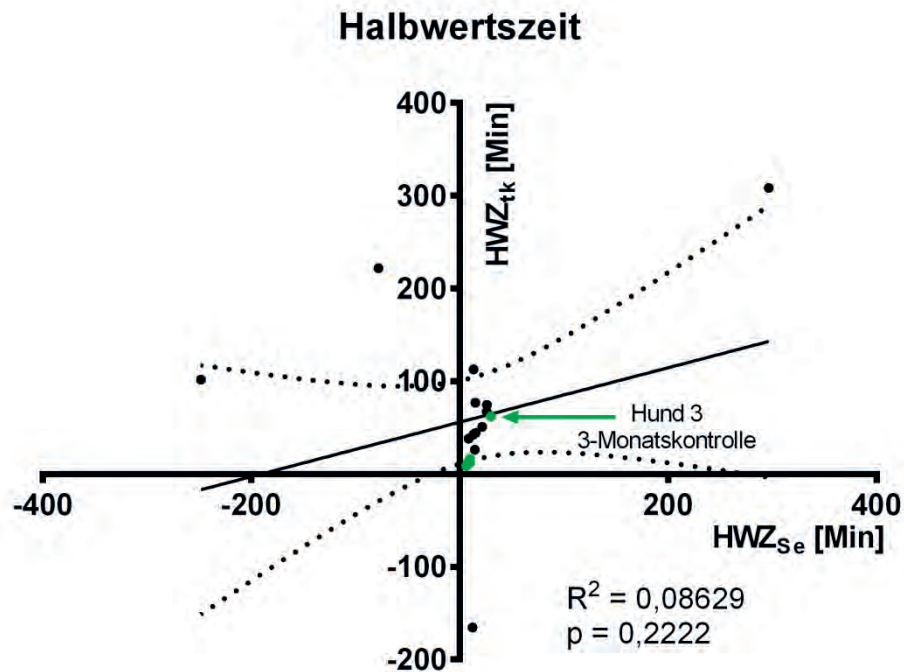
Für PDR_{Se} und PDR_{tk} sowie für $R15_{Se}$ und $R15_{tk}$ wurde ein linearer Zusammenhang mit einer Steigung, die sich signifikant von Null unterschied, ermittelt. R^2 betrug 0,6169 für die PDR und 0,4629 für die R15. Dabei lag die R15, wie aus der Abbildung ersichtlich, für Hunde mit verschlossenem PSS mit beiden Messmethoden niedriger als für Hunde mit offenem PSS. Umgekehrt verhielt es sich mit der PDR. Eine Ausnahme bildete jeweils Hund 3 bei der Dreimonatskontrolle (vgl. auch vorangegangene Kapitel). Der Unterschied war mittels transkutaner Messmethode für beide Parameter deutlicher.

Für HWZ_{Se} und HWZ_{tk} erzielte die lineare Regression lediglich ein $R^2 < 0,1$. Die ermittelte Gerade beschrieb die Daten kaum besser als eine horizontale Linie durch deren Mittelwert. Wurden hingegen die Messungen aus der Berechnung ausgeschlossen, bei denen entweder HWZ_{Se} oder HWZ_{tk} einen negativen Wert besaßen (Ausreißer), so bestand ein linearer Zusammenhang mit $R^2 < 0,8792$ und $p < 0,0001$. Für die drei als Ausreißer gekennzeichneten Datensätze galt, dass zum Messzeitpunkt jeweils ein offener PSS vorlag.

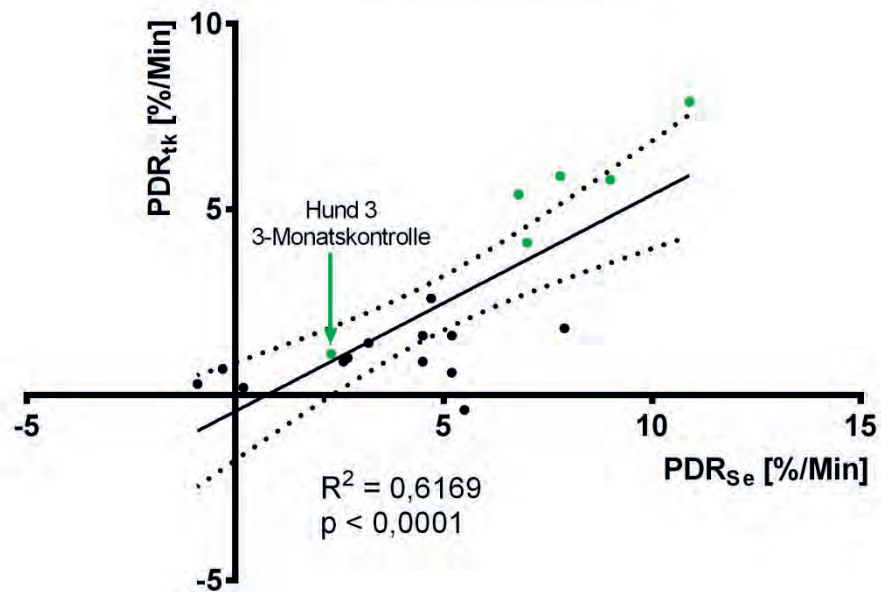
Insgesamt schlossen PDR und R15 besser ab als der klassische Parameter HWZ. Im Speziellen schnitt die transkutane Messmethode bei PDR und R15 besser ab als die invasive hinsichtlich Überlappung und signifikanter Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten (vor Eingriff versus Dreimonatskontrolle) und dem Verschlussgrad des PSS. Anhand der HWZ wurde mit keiner Methode ein signifikanter Unterschied nachgewiesen. In Tabelle IV-11 sind die p-Werte zusammengestellt.

Abbildung IV-13: lineare Regression zwischen transkutan und invasiv ermittelter Halbwertszeit, Plasmaverschwinderate und 15-Minuten-Retentionsrate

schwarze Punkte: offener PSS, grüne Punkte: verschlossener PSS, rote Punkte: Ausreißer, punktierte Linien: Grenzen des 95%-Konfidenzbandes, R^2 : Determinationskoeffizient der ermittelten Geraden, p: p-Wertes der Nullhypothese (Steigung der Geraden entspricht Null)



Plasmaverschwinderate



15-Minuten-Retentionsrate

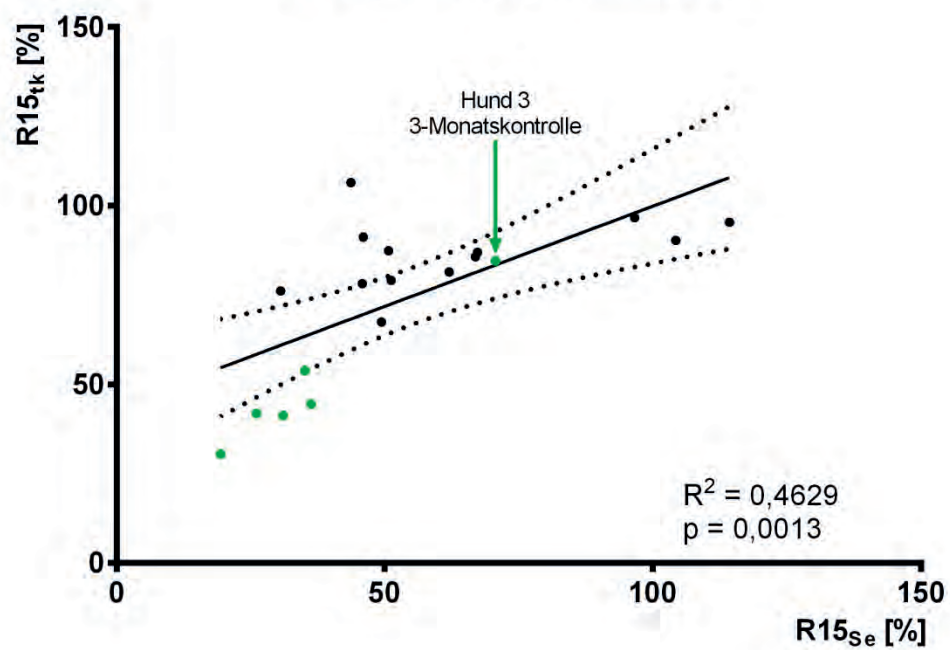


Tabelle IV-11: Signifikante Unterschiede der ermittelten Parameter der transkutanen und invasiven Messmethode hinsichtlich Messzeitpunkt und Verschlussgrad des PSS

ns: nicht signifikant unterschiedlich; s: signifikant unterschiedlich

Parameter	p-Wert	
	vor Eingriff vs. 3-Monatskontrolle	offener vs. verschlossener PSS
HWZ _{Se}	0,5703 (ns)	0,2001 (ns)
HWZ _{tk}	0,4258 (ns)	0,2323 (ns)
PDR _{Se}	0,1037 (ns)	0,0095 (s)
PDR _{tk}	0,0171 (s)	<0,0001 (s)
R15 _{Se}	0,3594 (ns)	0,0323 (s)
R15 _{tk}	0,0209 (s)	<0,0001 (s)

V Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Studie liegt auf der Evaluation der Anwendbarkeit der transkutan fluorometrisch und der invasiv gemessenen ICG-Elimination. Daher wird in diesem Kapitel auf das Patientengut sowie die durchgeführten Laboruntersuchungen nur kurz eingegangen. Für tiefergehende Informationen zu den Charakteristika des ePSS beim Hund sei auf Kapitel II und auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

Die transkutane fluorometrische Bestimmung der ICG-Eliminationskinetik ließ sich einfach und komplikationslos durchführen. Sie erwies sich als gut geeignet zur Unterscheidung zwischen einem offenen und einem verschlossenem PSS beim Hund und war diesbezüglich der invasiven Bestimmung der Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben überlegen.

1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine orientierende prospektive Studie. Sie hat sich die Untersuchung der Machbarkeit der transkutanen fluorometrischen Bestimmung der ICG-Elimination bei Hunden mit ePSS zum Ziel gesetzt. Es sollte geklärt werden, ob prinzipiell eine Unterscheidung zwischen offenem und verschlossenem PSS anhand dieser Methode möglich ist. Außerdem wurde ein Verfahren zur Auswertung der Eliminationskurven entwickelt, dessen Anwendbarkeit in weiteren Studien untersucht werden muss. Referenzwerte der transkutanen fluorometrischen Bestimmung der ICG-Elimination beim Hund und die Ermittlung von Sensitivitäten oder Spezifitäten müssen Inhalt nachfolgender Studien sein. Daher wird die Anzahl von zehn Studienhunden als ausreichend angesehen.

Aufgrund der geringen Patientenzahl dürfen die Resultate wegen des verhältnismäßig starken Einflusses des Zufalls nicht als allgemeingültig angesehen werden. Bei kleinen Stichprobenzahlen werden schwächere Zusammenhänge zudem leicht übersehen, während stärkere Korrelationen noch nachgewiesen werden können (Schneider et al., 2010).

In die Studie wurden nur Hunde mit einem singulären kongenitalen ePSS als Modellerkrankung einer Leberfunktionsstörung eingeschlossen. Eine Aussage über die Übertragbarkeit der Resultate auf Leberdysfunktionen anderer Ätiologie kann nicht getroffen werden.

2 Patientengut

Die Rasseverteilung unter den Studiehunden entsprach den Angaben in der Literatur. Ein gehäuftes Auftreten von kongenitalen ePSS ist sowohl für den Yorkshire Terrier als auch für Dackel und Mops beschrieben (Tobias, 2003; Tobias und Rohrbach, 2003; d'Anjou et al., 2004). Ebenso stimmen Alter und Größe der Hunde zum Zeitpunkt des Shuntverschlusses mit der Literatur überein (van den Ingh et al., 1995; Watson und Herrtage, 1998; Hunt und Hughes, 1999; Winkler et al., 2003; d'Anjou et al., 2004; Kummeling et al., 2006; Szatmári und Rothuizen, 2006; Adam et al., 2012).

In der vorliegenden Studie war bei 40 % der Hunde ein Sofortverschluss des PSS mittels Seidenligatur möglich, wobei ein Hund postoperativ verstarb. Die Hälfte der Hunde (3/6 Hunde), bei denen ein Cellophan Banding erfolgt war, wiesen bei der Dreimonatskontrolle einen verschlossenen PSS auf. Es wird berichtet, dass ein sofortiger Shuntverschluss bei 26-60 % der Hunde durchgeführt werden kann (Hunt und Hughes, 1999; Winkler et al., 2003; Broome et al., 2004). Ein vollständiger Verschluss im Rahmen eines Cellophan Bandings kann bereits nach drei Monaten vorliegen, wird aber, vor allem in Abhängigkeit vom Durchmesser des PSS nach Cellophan Banding, nicht bei allen Hunden erreicht (Youmans und Hunt, 1998; Hunt et al., 2004; Frankel et al., 2006).

Das Patientengut ist somit trotz der geringen Anzahl an Studiehunden repräsentativ.

3 Laboruntersuchungen

Bezüglich näherer Informationen zum Einsatz und der Bedeutung der einzelnen Leberfunktionsparameter sei auf Kapitel II4 verwiesen.

3.1 Hämatologische Parameter

Die Resultate der hämatologischen Untersuchung decken sich mit den Angaben aus der Literatur (Kapitel 4.1). CHr und MCV zeigten sich sehr sensitiv zur Detektion eines PSS und stiegen nach Verschluss bei allen Hunden in den Referenzbereich, während Hämatokrit und Erythrozytenzahl nur mäßige bis schlechte Indikatoren darstellten.

3.2 Blutchemische Parameter

Hinsichtlich der blutchemischen Untersuchung konnten ebenfalls weitestgehend die Literaturangaben bestätigt werden (Kapitel II4.2). Alumin-, Cholesterin- und Harnstoffkonzentration wiesen signifikante Unterschiede hinsichtlich des Messzeitpunktes (vor Eingriff beziehungsweise bei der Dreimonatskontrolle) sowie des Verschlussgrades des PSS (offener beziehungsweise verschlossener PSS) auf. Eine Hypoglykämie wurde bei keinem der Studiehunde beobachtet. Im Gegensatz dazu wird in unterschiedlichen Quellen von einem Auftreten bei 9,6-40 % der Hunde mit cPSS berichtet (Johnson et al.,

1987; Tisdall et al., 1994; Richter, 2003; Holford et al., 2008; Collings et al., 2012; Caporali, et al., 2015). Diese Diskrepanz hängt möglicherweise mit der medikamentellen und diätetischen Vorbehandlung der Hunde zusammen.

3.3 Gallensäurenstimulationstest und Ammoniaktoleranztest

Die in verschiedenen Untersuchungen ermittelte gute Sensitivität und Spezifität von GST und ATT (Kapitel II4.5) spiegelt sich auch in der vorliegenden Studie wider.

Bereits anhand der präprandialen Serumgallensäurenkonzentration war eine sichere Unterscheidung zwischen offenem und verschlossenem PSS möglich.

Bei der Ammoniakmessung identifizierte der ATT, nicht aber der basale Wert, sicher einen PSS. Bei Hund 3 lag bei der Dreimonatskontrolle ein falsch positiver ATT vor. Zu diesem Zeitpunkt glich auch die ICG-Elimination mit beiden Messmethoden der eines offenen PSS. Auf diese Diskrepanz wird in Kapitel 4.4 näher eingegangen.

Hinsichtlich des Referenzbereiches der Blutammoniakkonzentration und der Interpretation des ATT existieren keine einheitlichen Angaben. Für die basale Blutammoniakkonzentration wird ein oberer Referenzwert von 45 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ angeführt (Goggs et al., 2008; Ruland et al., 2010; Rothuizen, 2012; Neumann, 2013a; van Straten et al., 2015). Aufgrund der Vielzahl an Messmethoden und der Fehleranfälligkeit der Messung sollten gerätespezifische Referenzwerte verwendet werden. In der vorliegenden Studie wurde das Point-of-care Analysegerät PocketChem BA PA-4130^a eingesetzt, für das ein Referenzbereich von 60 $\mu\text{mol/l}$ vorgeschlagen wird (Goggs et al., 2008). Der ATT wird je nach Autor als positiv angesehen, wenn der obere Referenzbereich (van Straten et al., 2015), ein Anstieg von 32 % (Richter, 2003), das Eineinhalb- bis Zweifache (Ruland, 2009) oder das Zweifache des Basalwertes (Center, 1996; Cullen et al., 2006; Neumann, 2013a) überschritten wird. Für manche Autoren scheint die Interpretation des Anstieges gegenüber dem Basalwert sinnvoller als die Orientierung an einem absoluten Referenzwert (Center, 1990).

In der vorliegenden Studie wurde der für das verwendete Analysegerät vorgeschlagene Referenzwert von 60 $\mu\text{mol/l}$ (Goggs et al., 2008) übernommen. Rückblickend gelang damit, abgesehen von Hund 3 bei der Dreimonatskontrolle, eine sichere Unterscheidung zwischen offenem und verschlossenem PSS. Die Verwendung des doppelten Basalwertes als variablen oberen Referenzbereich für den ATT hätte hingegen zu mehreren falsch positiven Resultaten geführt.

^a PocketChem BA PA-4130, Arkray, Inc., Kyoto, Japan

4 ICG-Elimination

4.1 Transkutane fluorometrische Messung der Blut-ICG-Elimination

Die Rohdaten der transkutan fluorometrisch ermittelten ICG-Elimination bereiteten aufgrund von Schwankungen und Kurvensprüngen Schwierigkeiten in der unmittelbaren Analyse. Durch die schrittweise Bearbeitung der ICG-Eliminationskurve wurde im Allgemeinen eine gute computerbasierte Auswertbarkeit erzielt.

Die Kurvensprünge in den beiden Messreihen zeigten häufig einen gegenläufigen Charakter (Kapitel IV3.1.2). Durch Bildung der Mittelwerte wurde eine Glättung der Eliminationskurve erreicht. Während der Messung waren die beiden Devices jeweils gegenüberliegend auf der rechten und linken Thoraxseite angebracht. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich bei den Kurvensprüngen um Bewegungsartefakte handelt. Mögliche Ursache ist eine mangelnde Fixation des Devices auf der Haut, sodass durch eine bewegungsassoziierte Positionsänderung die Entfernung zu Hautgefäßen und somit die Intensität der registrierten ICG-Fluoreszenz verändert wird. Artefakten durch Lichteinfluss wurde durch die Abdeckung mit schwarzer, lichtundurchlässiger Folie, einem Schulterverband sowie bei einem Großteil der Messungen durch eine zusätzliche Lage handelsüblicher Aluminiumfolie vorgebeugt. Inwiefern Fell- und Hautfarbe, -beschaffenheit oder unvollständig geschorenes Fell der Hunde beispielsweise durch Eigenfluoreszenz, Reflexion oder Streuung die Auswertbarkeit der Kurven beeinträchtigen, ist nicht untersucht. Allgemein kann von einer geringen Interferenz durch Eigenfluoreszenz oder Absorption im betreffenden Wellenlängenbereich ausgegangen werden (Saxena et al., 2003).

Auffällig war, dass die Kurven von Hunden mit verschlossenem PSS tendentiell einen ruhigeren Verlauf mit höherem R^2_{tk} besaßen als die von Hunden mit offenem PSS. Somit muss ein Zusammenhang der Kurvenqualität mit der Leberfunktion überdacht werden. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre die Anwesenheit von fluoreszierenden Substanzen im Blut von Hunden mit PSS, die mit der Messung interferieren. Es könnte sich hierbei um Stoffwechselprodukte handeln, die über die Leber ausgeschieden werden und daher bei Hunden mit PSS in erhöhter Konzentration vorliegen. Abbauprodukte von ICG selbst scheinen nicht mit dem Emissionsspektrum von ICG zu interferieren (Saxena et al., 2003). Möglicherweise ist der tendentiell unruhigere Kurvenverlauf bei Hunden mit offenem PSS auch der langsameren ICG-Elimination geschuldet, die dazu führt, dass sich Messungenauigkeiten prozentual stärker auswirken als bei niedrigeren ICG-Konzentrationen im Rahmen einer schnellen Elimination.

Die monoexponentielle Eliminationskinetik beim Hund bis mindestens 15 Minuten nach Injektion von ICG, wie von Center et al. (1983) beschrieben (Kapitel II5.2), konnte auch in der transkutanen fluorometrischen Messung der vorliegenden Studie bestätigt werden. In

Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen beim Menschen (Wiegand et al., 1960; Clements et al., 1987) fiel auf, dass die Hunde mit offenem PSS tendentiell eher eine monophasische exponentielle Eliminationskinetik über den gesamten Messzeitraum aufwiesen, während bei Hunden mit verschlossenem PSS eine biexponentielle Kinetik bestand. Die mehrphasige exponentielle Kinetik begründet, weshalb die Kurven innerhalb des Messzeitraumes auch bei verschlossenem PSS nicht auf das Niveau des Backgroundes zurückkehrten.

Eine ansteigende ICG-Eliminationskurve, wie sie Hund 9 vor Eingriff zeigte, ist nach Wissen des Autors bislang nicht beschrieben. Da die Kurve über den gesamten Messzeitraum von über einer Stunde ansteigend war, ist ein Artefakt unwahrscheinlich. In der Serum-ICG-Elimination fand sich dieser Verlauf nicht wieder. Bei der Dreimonatskontrolle zeigte Hund 9 eine zügig abfallende Kurve in der transkutanen Messung. Die Ursache der ansteigenden Kurve vor Eingriff ist unklar. Diskutiert werden kann eine intrakutane Anreicherung von ICG (oder von Proteinen mit gebundenem ICG) bei gleichzeitig sinkender Serumkonzentration (infolge der intrakutanen Anreicherung oder einer hepatischen Elimination). Gründe für eine solche intrakutane Anreicherung sind nicht bekannt und rein spekulativ. Anzeichen für eine Dermatitis, die mit einer gesteigerten Durchblutung einhergehen könnte, bestanden nicht. Eventuell könnte das Vorhandensein von Proteinen mit einer hohen Bindungsaffinität für ICG in der Haut zu einem solchen Effekt führen. Möglicherweise fördert auch eine stark beeinträchtigte Leberfunktion mit hohen Serum-ICG-Konzentrationen einen Übertritt von ICG aus dem Plasmakompartiment ins Gewebe.

Die Evaluation der ICG-Eliminationskinetik erfolgte anhand von PDR und R15, die sich als wichtigste Messgrößen der transkutanen pulsdensitometrischen Messung in der Humanmedizin etabliert haben, und der HWZ, einer der klassischen Messgrößen beim Hund.

Insgesamt lieferte die transkutane fluorometrische Messung der ICG-Elimination vielversprechende Ergebnisse. Die PDR_{tk} und die $R15_{tk}$ schnitten dabei besser ab als die HWZ_{tk} . Mit Ausnahme von Hund 3 ermöglichten die beiden erstgenannten Parameter jeweils eine überlappungsfreie Unterscheidung zwischen offenem und verschlossenem PSS. Im Vergleich zur invasiven Messmethode mittels serieller Blutprobenentnahme, die als etablierte Referenzmethode diente, erbrachte die transkutane Messmethode damit bessere Resultate. Einschränkend muss die vergleichsweise kleine Studienpopulation bedacht werden.

4.2 Serum-ICG-Elimination aus seriell entnommenen Blutproben

Als Referenzmethode der ICG-Elimination wurde die invasive Messung aus seriell entnommenen Blutproben gewählt. Sie gilt als Goldstandard. In der Regel wird eine spektrophotometrische Analyse durchgeführt (Levesque et al., 2016). In der vorliegenden Studie wurde, analog zur transkutanen Messmethode, eine fluorometrische Bestimmung verwendet. Sie kann ebenfalls zur ICG-Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden (Saxena et al., 2003). Anhand einer Standardkurve wurde für jede Messung der lineare Zusammenhang von Fluoreszenz und Serum-ICG-Konzentration innerhalb des benötigten Messbereiches mit $R^2 > 0,99$ belegt. Dies zeigt die Zuverlässigkeit der gewählten Referenzmethode.

Bei Hund 8 vor Eingriff und bei Hund 7 zu beiden Messzeitpunkten lieferte die nichtlineare Regression keine verlässlichen Resultate aufgrund starker Schwankungen in den ersten 15 Minuten nach Injektion. Ähnliche Schwankungen waren auch mittels transkutaner Messmethode nachweisbar, jedoch erhöhte sich hier die Güte der angenäherten Exponentialfunktion aufgrund der Vielzahl an Messdaten. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Schwankungen mit der eingeschränkten Leberfunktion und nicht mit der invasiven Messmethode selbst zusammenhängen. Mögliche Gründe (Vorhandensein von fluoreszierenden Substanzen im Blut bei eingeschränkter Leberfunktion, Abweichungen durch stark verzögerte Eliminationsgeschwindigkeit) wurden bereits im vorangegangenen Kapitel 4.1 diskutiert.

Mit Ausnahme der drei genannten Messungen erbrachte das monoexponentielle Kurvenfitting zur Ermittlung von HWZ_{Se} , PDR_{Se} und $R15_{Se}$ eine ausreichende bis gute optische Übereinstimmung, die sich auch im zugehörigen Determinationskoeffizienten R^2_{Se} widerspiegelte. Dennoch fielen bei Hund 2 und Hund 9 Diskrepanzen im Vergleich zur transkutanen Messung und hinsichtlich des Verschlussgrades des PSS auf. Während die Serum-ICG-Elimination vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle einen vergleichbaren Kurvenverlauf und vergleichbare Werte für HWZ_{Se} , PDR_{Se} und $R15_{Se}$ lieferte, gelang mit der transkutanen Messmethode eine deutliche Unterscheidung von offenem PSS vor Eingriff und verschlossenem PSS bei der Dreimonatskontrolle.

Die invasive Messung, also der Goldstandard, schnitt somit schlechter ab bei der Differenzierung zwischen offenem und verschlossenem PSS. Ein schlechtes Kurvenfitting der invasiven Messmethode ist aus oben genannten Gründen ursächlich nicht plausibel.

Ein Zusammenhang mit der Art der Blutprobenentnahme ist möglich. Diese erfolgte über einen Venenverweilkatheter. Da es sich bei den Studienhunden überwiegend um kleinwüchsige Hunde handelte, bei denen kleinlumige Katheter verwendet wurden, kam es teilweise zu Verzögerungen während der Blutprobenentnahme. Zwar wurde der geplante Zeitpunkt der Blutprobenentnahme entsprechend auf den Endzeitpunkt

korrigiert, aber es besteht dennoch eine zeitliche Ungenauigkeit. Außerdem spiegelt die Serumprobe bei sehr langsamer Fließgeschwindigkeit des Blutes über den Venenverweilkatheter (in Einzelfällen bis zu 1,5 Minuten) nur eingeschränkt die tatsächliche Serum-ICG-Konzentration zu dem jeweiligen Zeitpunkt wider. Bessere Resultate hätten möglicherweise durch die Verwendung eines zentralvenösen (Hsieh et al., 2004; Grobelna et al., 2016) oder arteriellen Katheters (Kawasaki et al., 1984) erzielt werden können. Aufgrund der Invasivität dieser Maßnahmen und des erhöhten Blutungs- und Infektionsrisikos bei Hunden mit stark eingeschränkter Leberfunktion fiel bei der Studienplanung die Entscheidung für einen Venenverweilkatheter. Auch vor dem Hintergrund der Besitzercompliance wurde Wert auf eine möglichst geringe Invasivität gelegt.

Neben der Art der Blutprobenentnahme müssen auch präanalytischer Fehler im Hinblick auf die Instabilität von ICG zur Diskussion gestellt werden. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Blutproben zum Schutz vor einem vorzeitigen Abbau in eine lichtgeschützte Box verbracht (Gathje et al., 1970). In Plasma ist ICG für vier Stunden stabil, weshalb die Proben nach maximal vier Stunden abzentrifugiert und bei -80 °C tiefgefroren wurden (Landsman et al., 1976). Inwiefern die Verwendung von Serum anstelle von Plasma einen Einfluss auf die Stabilität von ICG hat, ist nicht bekannt. Bis zum Versand auf Trockeneis wurden die Serumproben über wenige Wochen bis hin zu ungefähr eineinhalb Jahren bei -80°C gelagert. Die Stabilität von ICG in tiefgefrorenen Serumproben wurde bei -20°C und -70°C evaluiert (March et al., 1994). Während bei -20°C bereits nach einer Woche ein vollständiger ICG-Abbau festgestellt wurde, konnte bei einer Lagerungstemperatur von -70°C eine konstante Serum-ICG-Konzentration über vier Wochen nachgewiesen werden. Danach nahm die ICG-Konzentration langsam ab, wobei bis zum Ende der Studie nach 29 Wochen mindestens 50 % der Anfangskonzentration, in niedrigen Konzentrationen bis zu 94 %, nachweisbar waren. In die Analyse gingen jeweils sechs Proben drei verschiedener ICG-Konzentrationen ein. Bei genauer Betrachtung der Resultate war allerdings kein kontinuierlicher Abfall der ICG-Konzentration mit zunehmender Lagerungsdauer nachvollziehbar. Gerade bei der niedrigen ICG-Konzentration von 0,3 µg/ml traten starke Schwankungen zwischen den Messwerten mit einem initialen Konzentrationsanstieg und darauffolgendem -abfall und schließlich einem erneutem -anstieg auf. Im Unterschied zur vorliegenden Studie erfolgte die Lagerung mit -70°C bei einer höheren Temperatur und es wurde humanes Serum verwendet, sodass die Ergebnisse nicht uneingeschränkt übernommen werden können. Für eine Lagerung von Serumproben bei -80°C liegen keine Daten vor. Von einer verbesserten Stabilität des ICG bei niedrigeren Temperaturen kann aber ausgegangen werden (March et al., 1994; Saxena et al., 2003). Dennoch ist die Dauer der Probenlagerung in der vorliegenden Studie kritisch zu hinterfragen. Falsch niedrige

Resultate sind möglich. In der vorliegenden Studie war bei jeder Messung ein Abfall der ICG-Eliminationskurve nachweisbar. Die ICG-Konzentration lag folglich trotz der Lagerungsdauer innerhalb der Nachweisgrenzen der fluorometrischen Messmethode. Ausgewertet wurde der Kurvenverlauf anhand einer normierten Eliminationskurve, sodass ein konstanter Abfall der ICG-Konzentration in den Serumproben nach einer Degradationskinetik erster Ordnung ohne Auswirkungen bleibt. Solange ausreichende ICG-Konzentrationen zur fluorometrischen Analyse vorliegen, bleiben HWZ_{Se} , PDR_{Se} und $R15_{Se}$ unter diesen Bedingungen unverändert, im Gegensatz zur absoluten Serum-ICG-Konzentration und zur Serum-ICG-Clearance. Dass ICG einer solchen Degradationskinetik erster Ordnung unterliegt, wurde für wässrige Lösungen in der fluorometrischen Messung gezeigt (Saxena et al., 2003). Interessanterweise fiel in dieser Untersuchung allerdings auch auf, dass dennoch unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen vorlagen. Bei der höheren Anfangskonzentration ging der Abbau langsamer vonstatten als bei der niedrigen. Diesen Widerspruch konnten die Autoren nicht sicher erklären, spekulierten aber, ob Abbauprodukte von ICG möglicherweise durch Absorption zu Interferenzen führen. March et al. (1994) zeigten, dass bei -70°C ICG in der hohen Konzentration von $6,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Serum einem stärkeren Abbau unterliegt als in den niedrigen Konzentrationen von 2 und $0,3\text{ }\mu\text{g/ml}$, wobei die Daten aufgrund starker Schwankungen, wie bereits beschrieben, keinen Rückschluss auf eine Degradationskinetik zulassen.

Abschließend liegen keine gesicherten Erkenntnisse über die Degradationskinetik von ICG vor. Bei der Evaluation der Eliminationskurven der vorliegenden Studie kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Unterscheidbarkeit des Verschlussgrades des PSS bei Hund 2 und Hund 9 von der langen Probenlagerung herrührt. Die Interferenzen, die in den ersten 15 Minuten nach ICG-Injektion bei Hund 7 zu beiden Messzeitpunkten und bei Hund 8 vor Eingriff auftraten, hängen, wie vorgängig ausgeführt, eher mit der Leberfunktionsstörung zusammen.

4.3 Korrelation von invasiver und transkutaner Messmethode

Die lineare Regression ergab zwischen PDR_{Se} und PDR_{tk} ein R^2 von $0,6169$ und zwischen $R15_{Se}$ und $R15_{tk}$ ein R^2 von $0,4629$. Dementsprechend können 62% beziehungsweise 46% der Varianz in der transkutanen Messung durch die invasive Messung erklärt werden. Der Determinationskoeffizient R^2 zwischen HWZ_{Se} und HWZ_{tk} betrug hingegen nur $0,08629$. Erst nach Elimination aller negativen Werte konnte ein R^2 von $0,8702$ erzielt werden. Aufgrund der geringen Zahl an Datensätzen muss diese Ausreißerelimination jedoch unter Vorbehalt interpretiert werden. Die HWZ scheint auf Grundlage der vorhandenen Daten kein idealer Parameter zur Evaluation der ICG-Elimination zu sein. Kommerzielle humanmedizinische transkutane Systeme verzichten ebenfalls auf die Angabe der HWZ zugunsten von PDR und R15.

Grobelna et al. (2016) beschreiben in der einzigen weiteren Studie zur transkutan gemessenen ICG-Elimination beim Hund eine Korrelation zwischen transkutaner und invasiver Messmethode. Hier wurde der transkutanen pulsdensitometrischen Messung (LiMON^a) die spektrophotometrische Messung seriell entnommener Blutproben gegenüber gestellt. Für R15 lag R^2 bei 8 Hunden in Anästhesie bei 0,47 und bei 7 Hunden in der Aufwachphase bei 0,29. R^2 zwischen transkutan gemessenen PDR und invasiv gemessener ICG-Plasmaclearance betrug bei 8 Hunden in Anästhesie 0,14 und bei 7 Hunden in der Aufwachphase 0,81. Der letzte genannte Determinationskoeffizient von 0,81 lag somit oberhalb der in der vorliegenden Studie erzielten Determinationskoeffizienten. Jedoch muss die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses aufgrund der starken Schwankungen zwischen Hunden in Narkose und in der Aufwachphase kritisch hinterfragt werden.

In der Humanmedizin haben bereits viele Studien den Zusammenhang zwischen invasiven (fiberoptischer Katheter oder serielle Blutprobenentnahme) und transkutanen Messmethoden bei verschiedenen Indikationen verglichen. Es wurde eine gute bis sehr gute Korrelation nachgewiesen, mit einem Determinationskoeffizienten $R^2=0,977$ für R15 (Hsieh et al., 2004) und $R^2=0,855$ für die fraktionelle Extraktion k (Hsieh et al., 2004) beziehungsweise einem Korrelationskoeffizienten $r=0,81-0,84$ (entspricht $R^2=0,66-0,71$) für R15 (Purcell et al., 2006; Cheung et al., 2012), $r=0,93-0,94$ (entspricht $R^2=0,86-0,88$) für PDR (Sakka et al., 2000; Faybik et al., 2004) und $r=0,89$ (entspricht $R^2=0,79$) für die fraktionelle Extraktion k (Tsubono et al., 1996).

Grundsätzlich gilt, dass bei geringer Stichprobenzahl Zusammenhänge schwerer nachzuweisen sind. Empfohlen wird daher eine Mindestanzahl von 20 Beobachtungen pro untersuchte Einflussvariable (Schneider et al., 2010). Aufgrund des Versterbens von Hund 10 nach chirurgischem Verschluss des PSS konnten in der vorliegenden Studie nur 19 Datenpaare zur Analyse herangezogen werden. Die trotz geringer Stichprobenzahl nachgewiesene Korrelation mit $R^2=0,6169$ (PDR) beziehungsweise $R^2=0,4629$ (R15) unterschätzt somit möglicherweise die tatsächliche Korrelation. Diese Annahme wird gestützt von den oben genannten Daten aus der Humanmedizin, die eine sehr enge Korrelation von transkutaner und invasiver Messmethode belegen.

Desweiteren ist die Korrelation grundlegend von der Güte der gewählten Referenzmethode abhängig. Auch wenn es sich bei der invasiven Messmethode um den Goldstandard handelt, mit der die transkutane fluorometrische Messmethode verglichen wird, so ist sie in der vorliegenden Studie der transkutanen Messung unterlegen. Die transkutane fluorometrische Messmethode erlaubte mit Ausnahme von Hund 3 bei der Dreimonatskontrolle eine klare Unterscheidung zwischen verschlossenem und offenem

^a Pulsion Medical Systems SE, München, Deutschland

PSS. Sie überstieg damit die Genauigkeit der invasiven Messung, die nur mäßig mit dem Verschlussgrad des PSS übereinstimmte. Somit ist die Beurteilung der transkutanen fluorometrischen Methode im Vergleich zur Referenzmethode nur eingeschränkt möglich. Es ist davon auszugehen, dass die nachgewiesene Korrelation die tatsächliche unterschätzt.

4.4 Interpretation der Resultate von Hund 3

Bei Hund 3 wurde sonographisch und angiographisch ein Portoazygosshunt ausgehend von der Milzvene diagnostiziert. Mittels Cellophan Banding wurde ein progressiver Shuntverschluss initiiert. Die transabdominale Splenoportographie im Rahmen der 3-Monatskontrolle bewies den vollständigen Verschluss des PSS.

Bei der transkutanen Messung der ICG-Elimination deckten sich die Resultate der Dreimonatskontrolle (Kurvenverlauf, HWZ_{tk} , PDR_{tk} , $R15_{tk}$) nahezu vollständig mit den vor Eingriff erhobenen Befunden. Bei der invasiven Messung ergab sich sogar eine langsamere Eliminationskinetik als vor dem Eingriff. Somit stehen die Resultate von Hund 3 im Gegensatz zu denen der anderen fünf Hunde mit verschlossenem PSS, bei denen mindestens mit der transkutanen Messmethode eine Differenzierung möglich war.

Die allgemeine klinische Untersuchung von Hund 3 bei der Dreimonatskontrolle verlief ohne besonderen Befund. Anamnestisch zeigte der Hund keine Symptome eines PSS mehr, wie sie ursprünglich zum Zeitpunkt der Erstvorstellung vorgelegen hatten. Die hämatologische und blutchemische Untersuchung inklusive des Plasmabilirubinspiegels zum Zeitpunkt der Dreimonatskontrolle war bis auf eine Hypercholesterinämie unauffällig. Diese lässt sich eher nicht im Sinne einer Cholestase interpretieren, da andere Laborwertveränderungen wie eine Hyperbilirubinämie oder eine erhöhte Aktivität von Alkalischer Phosphatase oder γ -Glutamyltransferase fehlten. Anhand des GST ergab sich kein Hinweis auf eine Leberfunktionsstörung. Der orale ATT hingegen war positiv.

Zwar wurde ein vollständiger Verschluss des PSS dokumentiert. Mittels Splenoportographie lassen sich jedoch kaudal der Milzvene gelegene Shuntgefäße, beispielsweise portosystemische Kollateralen ausgehend von den Mesenterialvenen, nicht sicher nachweisen (Suter, 1975). Diese könnten den positiven ATT und die Befunde der invasiven und transkutanen ICG-Elimination erklären.

Ebenso ist eine Leberfunktionseinschränkung anderer Genese nicht auszuschließen. Bei Hund 3 handelte es sich um einen Mops, der zu den brachycephalen Rassen zählt. Bei der Dreimonatskontrolle war der rasse typische Stridor nasalis und pharyngealis nachweisbar. Bei Hunden mit respiratorischen Beschwerden durch einen Trachealkollaps wurde eine sekundäre Leberdysfunktion gezeigt (Bauer et al., 2006). Die Autoren vermuteten eine hypoxische Leberschädigung infolge einer chronischen arteriellen Hypoxämie, analog zur hypoxischen Hepatitis bei akuter Exazerbation chronischer

respiratorischer Erkrankungen beim Menschen. Vergleichbare Studien zum Zusammenhang von Brachycephalie und Hepatopathie beim Hund fehlen. Es ist allerdings bekannt, dass brachycephale Rassen wie der Mops regelmäßig eine Leistungsintoleranz und eine verminderte arterielle Sauerstoffsättigung aufweisen (Hoareau et al., 2012; Bartels et al., 2015). Eine sekundäre Hepatopathie bei Hund 3 infolge der chronischen Obstruktion der oberen Atemwege ist also möglich.

Auch Leberdysfunktionen im Zuge einer Medikamentenreaktion oder einer Intoxikation (z. B. Aflatoxine) lassen sich retrospektiv nur schwer diagnostizieren, zumal aufgrund des guten Allgemeinbefindens von Hund 3 keine weiterführende Diagnostik wie die Entnahme einer Leberbiospie durchgeführt wurde, und müssen differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (Watson, 2004).

4.5 Evaluation von HWZ, PDR und R15 im Vergleich zur Literatur

Eine Übersicht über die beschriebenen Normalwerte verschiedener Messgrößen der ICG-Elimination bei Mensch und Hund findet sich in Tabelle II-2.

In Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen bestätigte sich die langsamere ICG-Eliminationskinetik des Hundes im Vergleich zum Menschen (Klaassen und Plaa, 1969; Center, 1996). Außerdem scheinen bei der transkutanen fluorometrischen Messung beim Hund, wie auch bei den humanmedizinischen transkutanen pulsdensitometrischen Systemen, PDR und R15 gut geeignet zur Evaluation der Leberfunktion (siehe auch Kapitel 4.1 und 4.3).

Für die Serum-ICG-Elimination bei Hunden mit verschlossenem PSS zeigte sich, mit Ausnahme von Hund 3, eine gute Übereinstimmung mit diesen Literaturangaben (Ketterer et al., 1960; Center et al., 1983; Grobelna et al., 2016). HWZ und PDR lagen jeweils innerhalb des beschriebenen Bereiches von 8,4-10,8 Min oder darunter beziehungsweise von 6,9-8,7 %/Min oder darüber. Lediglich Hund 9 erreichte bei verschlossenem PSS mit 6,8 %/Min eine geringfügig schlechtere PDR_{Se} . Bezogen auf die R15 liegen lediglich Vergleichswerte von 8 gesunden Beagle in Narkose beziehungsweise in der Aufwachphase, gemessen mit serieller Blutprobenentnahme (Spektrophotometrie) und transkutaner pulsdensitometrischer Messung, vor (Grobelna et al., 2016). Die Werte der $R15_{Se}$ bei verschlossenem PSS in der vorliegenden Studie sind mit diesen vergleichbar bis geringgradig höher.

Die Median- und Mittelwerte der transkutanen fluorometrischen Messung lagen, verglichen mit der invasiven Messung, höher im Falle von HWZ und R15 und niedriger im Falle der PDR. Die transkutane fluorometrische Messung scheint demnach einer langsameren ICG-Eliminationskinetik zu folgen. Zur weiteren Evaluation bedarf es der Etablierung eines spezifischen Referenzbereiches.

4.6 Einfluss der verwendeten ICG-Dosierung

Bei der Beurteilung von HWZ, PDR und R15 muss bedacht werden, dass die Eliminationskinetik von ICG dosisabhängig ist (Kapitel II5.2.1). Einige Autoren stellten eine inverse Beziehung zwischen PDR und Dosierung fest (Leevy et al., 1967; Center et al., 1983; Rakich et al., 1987), während andere keinen signifikanten oder klinisch relevanten Unterschied nachweisen konnten (Cherrick et al., 1960; Center et al., 1983; Sakka et al., 2004; Halle et al., 2014).

Die hier verwendete Dosierung von 0,2 mg/kg ICG leitet sich aus der Dosisfindungsstudie zur transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination ab, die der vorliegenden Studie vorangestellt wurde (Strommer et al., 2015). Es handelt sich um eine vergleichsweise niedrige Dosierung, die bislang beim Hund nicht etabliert ist. Es liegen folglich auch keine dosisspezifischen Referenzbereiche für andere Messverfahren vor.

Ein höhere Sensitivität niedriger ICG-Dosierungen für Veränderungen der Leberperfusion ist beschrieben (Paumgartner et al., 1969), sodass die Verwendung niedriger Dosierungen zur Detektion eines PSS sinnvoll erscheint. In der Humanmedizin hat sich eine ähnliche Dosierung von 0,25 mg/kg im Vergleich zur Standarddosierung von 0,5 mg/kg als ausreichend zur zuverlässigen, frühzeitigen Erkennung von Leberfunktionsstörungen unterschiedlicher Genese in der transkutanen Messung erwiesen (Sakka et al., 2004; de Liguori Carino et al., 2009; Halle et al., 2014). Auch wenn beim Hund bislang deutlich höhere Dosierungen von 0,5-1,5 mg/kg Anwendung fanden, erscheint – gerade vor dem Hintergrund der langsameren Eliminationskinetik des Hundes – der Einsatz einer niedrigen Dosis von 0,2 mg/kg plausibel (Klaassen und Plaa, 1969; Center et al., 1983; Grobelna et al., 2016).

4.7 Einsatzmöglichkeiten in der Leberfunktionsdiagnostik

Die Leberfunktionsparameter der hämatologischen und blutchemischen Untersuchung sowie die Urinuntersuchung können wertvolle Hinweise auf eine Leberfunktionsstörung liefern, sind jedoch nur wenig spezifisch und häufig erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium verändert. Es besteht somit der Bedarf eines Tests mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität. Dieser sollte idealerweise kostengünstig, einfach durchführbar, nicht invasiv und stressfrei für den Patienten sein. Die Ergebnisse sollten schnell zur Verfügung stehen, um zeitnah über weitere diagnostische und therapeutische Schritte entscheiden zu können.

Dynamische Leberfunktionstests ermöglichen eine gezielte Evaluation der Leberfunktion unter Belastung im zeitlichen Verlauf. Sie stehen im Gegensatz zu den statischen Parametern der Hämatologie, Blutchemie oder der Messung der basalen Gallensäuren- und Ammoniakkonzentration. In der Veterinärmedizin sind GST und ATT die am häufigsten verwendeten dynamischen Leberfunktionstests. Wie in Kapitel II4.5.2

beschrieben, ist der ATT sensitiv und spezifisch für einen PSS, jedoch nur bei sehr weit fortgeschrittenem Leberparenchymuntergang positiv. Außerdem ist die Analyse fehleranfällig. Durch Hämolyse oder den Kontakt zu Speichel, Schweiß und Zigarettenrauch kann es zu falsch positiven Befunden kommen (Gerritzen-Bruning et al., 2006). Ammoniumchlorid kann nach oraler Verabreichung Vomitus oder Diarrhoe induzieren und besitzt eine schlechte Akzeptanz. Für den rektalen ATT ist ein vorheriger Einlauf notwendig. Außerdem kann durch die neurotoxische Wirkung von Ammoniak ein HES ausgelöst oder verschlimmert werden (Ruland, 2009).

Der GST ist für Hepatopathien im Allgemeinen sensitiver als der ATT. Allerdings können enterale Resorptionsstörungen, Magenentleerungsstörungen oder verlängerte intestinale Transitzeiten zu falsch negativen Resultaten und eine Cholestase zu falsch positiven Resultaten führen (Center, 1990; Center, 1996). Bei Hyperbilirubinämie ist der GST nicht aussagekräftig (Richter, 2003). Außerdem sind bei Yorkshire Terriern und Maltesern falsch positive Befunde mit der enzymatischen spektrophotometrischen Messmethode beschrieben (Tisdall et al., 1995; Tobias, 2003; O'Leary et al., 2014). Die Bestimmung der Serumgallensäurenkonzentration erfolgt vielerorts nach Versand in ein externes Labor, sodass die Resultate nicht unmittelbar zur Verfügung stehen.

Sowohl für den ATT als auch für den GST sind zwei Blutprobenentnahmen notwendig. Beide Tests sind nur am wachen Patienten einsetzbar. Bei Hunden, die beispielsweise im Krampfgeschehen oder im somnolenten beziehungsweise komatösen Zustand vorgestellt werden, können lediglich die Basalwerte bestimmt werden. Durch die erhöhte Muskelaktivität im Krampfgeschehen kann zudem die Ammoniakkonzentration ohne Vorliegen einer Leberfunktionsstörung erhöht sein (House, 2010).

Mithilfe einer transkutanen Messung der ICG-Elimination könnten viele der eben genannten Probleme umgangen werden. So besteht beispielsweise kein erhöhtes Risiko eines HES durch das verabreichte ICG. Eine einmalige intravenöse Injektion ist ausreichend. Blutprobenentnahmen werden nicht benötigt, was bei kleinen Patienten mit begrenztem Blutvolumen oder Anämie von Vorteil sein kann. In Kapitel II.5.1 wurde bereits ausführlich auf die zentrale Rolle und prognostische Bedeutung der transkutan gemessenen ICG-Elimination in der Leberfunktionsdiagnostik beim Menschen eingegangen. Folglich ist ihr Einsatz in der Veterinärmedizin mit großen Hoffnungen und hohen Erwartungen verbunden. Gerade die schnelle Verfügbarkeit der Messergebnisse und die Einsatzmöglichkeiten bei kritisch kranken Patienten sind von Vorteil. Die Messung ist sowohl am wachen als auch am komatösen Patienten möglich. So kann beispielsweise die Diagnose eines HES oder eines hepatischen Komas in Abgrenzung von Intoxikationen oder anderen Stoffwechselerkrankungen erleichtert werden. In der Humanmedizin ist auch der Einsatz im Rahmen der Anästhesieüberwachung möglich, beispielsweise als intraoperative Entscheidungshilfe bei Leberteilresektionen (Thomas et

al., 2015). Ähnliche Einsatzgebiete in der Routinediagnostik und Früherkennung von Hepatopathien, der Intensivmedizin oder der Anästhesieüberwachung sind auch in der Veterinärmedizin denkbar. Hilfreich wäre sie auch bei Abklärung von Hyperammonämien, für die differentialdiagnostisch, neben PSVA und anderen Leberfunktionsstörungen, Harnstoffzyklusdefekte, die transiente Hyperammonämie des Irischen Wolfshundes und Cobalaminrezeptordefekte in Frage kommen (Center, 1996; Meyer et al., 1996; Zandvliet und Rothuizen, 2007; Owczarek-Lipska et al., 2013; Fyfe et al., 2014).

Eine diagnostische Herausforderung stellt mitunter die Differenzierung von hepatischer und posthepatischer Hyperbilirubinämie dar. Bei diesen Patienten liegt häufig ein negativer ATT vor. Der GST ist bei Hyperbilirubinämie nicht aussagekräftig. Zwar wird auch die ICG-Eliminationskinetik durch Cholestase beeinflusst, da es sich aber um eine kompetitive Hemmung durch Bilirubin handelt, können möglicherweise verschiedene ICG-Dosierungen bei der Unterscheidung helfen.

In der vorliegenden Studie erwies sich die transkutane fluorometrische Messung der ICG-Elimination als einfach praktikabel. Sie wurde von allen teilnehmenden Hunden gut akzeptiert. Durch die Verwendung der Fluorometrie entfällt die Notwendigkeit zweier einander gegenüberliegender Geräteteile (Lichtquelle und Photosensor), wie sie die Spektrophotometrie beziehungsweise Pulsdensitometrie benötigt. Nach letzterem Prinzip arbeiten die kommerziell erhältlichen humanmedizinischen Systeme wie beispielsweise LiMON^a. Üblicherweise werden Finger-, Nasen-, oder Ohrenclips verwendet. Deren sichere Fixierung gelingt beim Menschen einfach, bereitet beim Tier jedoch Schwierigkeiten. In der einzigen veterinärmedizinischen Studie zur transkutanen pulsdensitometrischen Messung der ICG-Elimination wurde der LiMON^a-Clip nach Ausscheren eines Hautareals an der Rute von Hunden in Narkose und in der anschließenden Aufwachphase befestigt (Grobels et al., 2016). Unpraktikabler gestaltet sich dieses Verfahren vermutlich beim wachen Hund oder beispielsweise auch bei Katzen. Erfahrungsgemäß bereitet auch die Pulsoximetrie, die auf demselben Messprinzip beruht, bei diesen Patienten Schwierigkeiten. Da zur Registrierung der Fluoreszenz – im Gegensatz zur Absorption – die Photodiode nicht gegenüber der Lichtquelle positioniert werden muss, kann bei der Fluorometrie das Messdevice am Brustkorb des Tieres angebracht, sicher fixiert und kabellos eingesetzt werden.

^a Pulsion Medical Systems SE, München, Deutschland

5 Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Studie stimmen zuversichtlich hinsichtlich der Einsatzmöglichkeiten der transkutanen fluorometrischen ICG-Elimination in der Leberfunktionsdiagnostik beim Hund. Es sind allerdings weitere Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen notwendig. Vor dem klinischen Einsatz bedarf es außerdem Studien bei Hepatopathien anderer Ätiologie und der Etablierung von Referenzwerten. Ebenso ist der Einsatz bei anderen Tierarten, beispielsweise bei der Katze, interessant.

Zu klären ist weiterhin, ob und welche Substanzen im Blut von Hunden mit PSS zu Interferenzen bei der fluorometrischen Messung führen.

Durch eine optimierte Fixierung der Devices können Signalschwankungen und Kurvensprünge möglicherweise reduziert werden, sodass die Auslesung eines einzelnen Device ausreichend wäre. Um die Bedeutung von Bewegungsartefakten besser einschätzen zu können, sind Untersuchungen an Hunden in Narkose im Vergleich zu Hunden in Bewegung sinnvoll. Ebenso kann die Untersuchung des Einflusses von Fellfarbe und Hautpigmentation weitere Erkenntnisse liefern.

VI Zusammenfassung

Der portosystemische Shunt (PSS) stellt eine der häufigsten Leberfunktionsstörungen und die häufigste portosystemische vaskuläre Anomalie (PSVA) beim Hund dar. Darüber hinaus ist der kongenitale PSS (cPSS) die häufigste Ursache eines hepatoenzephalen Syndroms bei Hund und Katze. Zur Diagnose und prognostischen Bewertung einer Leberfunktionsstörung hat sich in der Humanmedizin in den letzten Jahren die transkutane spektrophotometrische Messung der Indocyaningrün (ICG)-Elimination durchgesetzt. Für den Hund ist die ICG-Elimination als dynamischer Leberfunktionstest bereits seit langer Zeit in Form einer invasiven Messung über eine serielle Blutprobenentnahme etabliert, wird jedoch aufgrund des aufwendigen Verfahrens nicht mehr routinemäßig durchgeführt. Verfahren zur transkutanen spektrophotometrischen oder fluorometrischen Messung der ICG-Elimination beim Hund wurden kürzlich beschrieben, bislang allerdings nur an gesunden Beagle mit kleiner Fallzahl.

Ziel der vorliegenden Studie war, die Anwendbarkeit eines neu entwickelten Systems zur transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination bei Hunden mit einem PSS vor und nach Verschluss des Shuntgefäßes im Vergleich zum Goldstandard, der invasiven Messung mittels seriell entnommener Blutproben, zu überprüfen. Weiterhin sollte anhand der transkutanen Messung der Unterschied vor und nach Verschluss des Shuntgefäßes beziehungsweise die Unterscheidbarkeit zwischen offenem und verschlossenem PSS untersucht werden.

In die prospektive Studie wurde zehn Hunde mit singulärem extrahepatischem PSS eingeschlossen, die zum chirurgischen Verschluss des Shuntgefäßes (Cellophan Banding oder Seidenligatur) in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt worden waren. Im Rahmen der Untersuchungen vor dem Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle nach dem Eingriff wurde neben hämatologischen (Hämatokrit, MCV, Erthrozytenzahl, CHr) und blutchemischen (Albumin, Harnstoff, Cholesterin, Glukose) Leberfunktionsparametern, einem Gallensäurenstimulationstest (GST) und einem Ammoniaktoleranztest (ATT) die ICG-Elimination auf zwei Arten bestimmt. Als Goldstandard diente die invasive Messmethode, bei der die Eliminationskinetik aus seriell entnommenen Blutproben fluorometrisch bestimmt wurde. Zeitgleich erfolgte eine transkutane fluorometrische Bestimmung der ICG-Eliminationskurve über zwei auf der Haut am Brustkorb angebrachte Messeinheiten (Devices). Für beide Messmethoden wurden mittels nichtlinearer Regression im Zeitintervall eine bis 15 Minuten nach ICG-Injektion die Halbwertszeit (invasiv aus Serumproben: HWZ_{Se} , transkutan: HWZ_{tk}), die Plasmaverschwinderate (PDR_{Se} , PDR_{tk}) und die 15-Minutenretentionsrate ($R15_{Se}$, $R15_{tk}$) berechnet. Der Verschlussgrad des PSS bei der Dreimonatskontrolle wurde anhand von Dopplersonographie und Splenoportographie definiert. Alle Parameter wurden auf signifikante Unterschiede vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle (gepaarte Analyse) beziehungsweise hinsichtlich offenem und verschlossenem PSS (ungepaarte Analyse) überprüft. Die Korrelation zwischen HWZ_{Se} und

HWZ_{tk}, zwischen PDR_{Se} und PDR_{tk} und zwischen R15_{Se} und R15_{tk} wurde mittels linearer Regression untersucht.

Bei 6/10 Hunden lag bei der Dreimonatskontrolle ein Verschluss des PSS vor. Bei 3/10 Hunden war der PSS noch offen. Ein Hund verstarb nach dem Eingriff, sodass keine Daten zur Dreimonatskontrolle vorlagen. Die Resultate von hämatologischer und blutchemischer Untersuchung, GST und ATT stimmten mit den Literaturangaben überein.

Die transkutane Messung der ICG-Elimination verlief komplikationslos, einfach und wurde von allen Hunden gut akzeptiert. Es war ein signifikanter Unterschied von PDR_{tk} und R15_{tk} zwischen Hunden vor Eingriff und bei der Dreimonatskontrolle (PDR_{tk}: $p=0,0171$, R15_{tk}: $p=0,0209$) und zwischen Hunden mit offenem und mit verschlossenem PSS (PDR_{tk}: $p<0,0001$, R15_{tk}: $p<0,0001$) nachweisbar. Anhand der HWZ_{tk} ergab sich jeweils kein signifikanter Unterschied. Mit Ausnahme von Hund 3 bei der Dreimonatskontrolle war anhand von PDR_{tk} und R15_{tk} mit folgenden Kriterien eine Unterscheidung zwischen offenem und verschlossenem PSS möglich:

- offener PSS:
PDR_{tk} $\leq 2,6$ %/Min
R15_{tk} $\geq 67,5$ %
- verschlossener PSS:
PDR_{tk} $\geq 4,1$ %/Min
R15_{tk} $\leq 53,9$ %

Die invasive Messung der ICG-Elimination ergab einen signifikanten Unterschied von PDR_{Se} ($p=0,0095$) und R15_{Se} ($p=0,0323$) zwischen Hunden mit offenem und verschlossenem PSS. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied für HWZ_{Se}, PDR_{Se} und R15_{Se} hinsichtlich des Messzeitpunktes und für HWZ_{Se} hinsichtlich des Verschlussgrades des PSS.

Die lineare Regression ermittelte für PDR_{Se} und PDR_{tk} sowie für R15_{Se} und R15_{tk} einen linearen Zusammenhang mit einem Determinationskoeffizienten $R^2=0,6169$ für die PDR und $R^2=0,4629$ für die R15. Für HWZ_{Se} und HWZ_{tk} erzielte die lineare Regression lediglich ein $R^2<0,1$. Wurden hingegen die Messungen aus der Berechnung ausgeschlossen, bei denen entweder HWZ_{Se} oder HWZ_{tk} einen negativen Wert besaßen (Ausreißer), so bestand ein linearer Zusammenhang mit $R^2<0,8792$. Für die drei als Ausreißer gekennzeichneten Datensätze galt, dass zum Messzeitpunkt jeweils ein offener PSS vorlag.

Als beste Parameter zur Beurteilung der ICG-Eliminationskinetik stellten sich PDR und R15 heraus. Sie besitzen auch in der Humanmedizin im Vergleich zu anderen Parametern wie der HWZ die größte Bedeutung. Die transkutane fluorometrische Messung war in der vorliegenden Studie dem Goldstandard, der invasiven Messung der ICG-Elimination, überlegen. Daher sind die Determinationskoeffizienten nur eingeschränkt zu interpretieren und unterschätzen vermutlich die Korrelation mit der tatsächlichen ICG-Elimination im Blut.

Aufgrund der schnellen Verfügbarkeit der Resultate, des dynamischen Charakters der Untersuchung und der geringen Invasivität sind weitere Studien zum Einsatz der transkutanen fluorometrischen Messung der ICG-Elimination beim Hund lohnenswert.

VII Summary

The portosystemic shunt (PSS) is one of the most common diseases with hepatic dysfunction and the most common portosystemic vascular anomaly in the dog. In addition, congenital PSS is the most common reason for hepatic encephalopathy in dogs and cats. In human medicine, transcutaneous spectrophotometric measurement of indocyanine green (ICG) elimination gained in importance in recent years for diagnosis and prognostic evaluation of hepatic dysfunction. In dogs, ICG elimination as an invasive method with serial blood sampling was established as a dynamic liver function test several decades ago, but due to its complex procedure, it is no longer part of the routine diagnostic tests. Methods for transcutaneous spectrophotometric or fluorometric measurement of ICG elimination in dogs were recently described, but only in a small number of healthy beagles.

The aim of the present study was to evaluate the applicability of a recently developed system for transcutaneous fluorometric measurement of ICG elimination in dogs with PSS before and after closure of the shunt vessel in relation to the gold standard, the invasive measurement with serial blood sampling. Further, the difference before and after closure of the shunt vessel respectively the distinguishability between open and closed shunt vessel should be analysed using the transcutaneous method.

Ten dogs with a single extrahepatic PSS that were presented to the small animal clinic of the Justus-Liebig-University of Gießen for surgical closure of the shunt vessel (cellophane banding or silk suture) were enclosed in the prospective study. Besides liver function parameters of the hematology (haematocrit, MCV, red blood cell count, CHr) and the blood chemistry panel (albumin, urea, cholesterol, glucose), a bile acid stimulation test (GST) and an ammonia tolerance test (ATT), we analyzed ICG elimination in two ways during the course of the investigations, once before the operation and once at the control visit after three months. The invasive method, in which elimination kinetic was measured fluorometrically in serial blood samples, served as gold standard. Simultaneously, two fluorometric devices attached to the skin on the thorax recorded the ICG elimination curve transcutaneously. For both methods, half life time (invasive in serum samples: HWZ_{Se} , transcutaneously: HWZ_{tk}), plasma disappearance rate (PDR_{Se} , PDR_{tk}) and 15 minutes retention rate ($R15_{Se}$, $R15_{tk}$) were calculated within one to 15 minutes after injection of ICG. The closure of the shunt vessel was defined at the control visit after three months based on Doppler sonography and splenoportography. All parameters were analysed for significant differences before the operation and at the control visit (paired analysis) as well as between open and closed PSS (unpaired analysis). Correlation between HWZ_{Se} and HWZ_{tk} , between PDR_{Se} and PDR_{tk} and between $R15_{Se}$ and $R15_{tk}$ was investigated with linear regression.

In 6/10 dogs, the shunt vessel was closed at the control visit after three months. In 3/10 dogs, the PSS was still open. One dog died after the operation so that no data for the control visit

after three months were available. The results of hematology, blood chemistry, GST and ATT were in agreement with the literature.

Transcutaneous measurement of ICG elimination was easily performed without complications, and was well tolerated by all dogs. There was a significant difference in PDR_{tk} and $R15_{tk}$ between dogs before the operation and at the control visit (PDR_{tk} : $p=0,0171$, $R15_{tk}$: $p=0,0209$) and between open and closed PSS (PDR_{tk} : $p<0,0001$, $R15_{tk}$: $p<0,0001$). For HWZ_{tk} , there was no significant difference. With the exception of dog 3, differentiation between open and closed PSS was possible using the following criteria:

- open PSS:
 $PDR_{tk} \leq 2,6 \text{ \%}/\text{Min}$
 $R15_{tk} \geq 67,5 \text{ \%}$
- closed PSS:
 $PDR_{tk} \geq 4,1 \text{ \%}/\text{Min}$
 $R15_{tk} \leq 53,9 \text{ \%}$

The invasive measurement of ICG elimination found a significant difference between PDR_{Se} ($p=0,0095$) and $R15_{Se}$ ($p=0,0323$) between dogs with open and closed PSS. No significant difference was seen for HWZ_{Se} , PDR_{Se} and $R15_{Se}$ regarding the time of measurement and for HWZ_{Se} regarding the degree of closure of PSS.

Linear regression revealed a linear correlation between PDR_{Se} and PDR_{tk} and between $R15_{Se}$ and $R15_{tk}$ with a coefficient of determination $R^2=0,6169$ for PDR and $R^2=0,4629$ for R15. For HWZ_{Se} and HWZ_{tk} , the linear regression indicated only $R^2<0,1$. When measurements with negative results for HWZ_{Se} or HWZ_{tk} were excluded (outliers), linear correlation was $R^2<0,8792$. The three measurements labelled as outliers were seen in dogs with an open PSS at the time of measurement.

The best parameters for evaluation of ICG elimination kinetic were PDR and R15. Similar to human medicine, they have the greatest importance compared to other parameters like HWZ. In the present study, transcutaneous fluorometric measurement was superior to the gold standard, the invasive measurement of ICG elimination. Therefore, interpretation of the coefficients of determination is limited. The correlation with the real ICG elimination in blood is most likely underestimated. Because of the rapid availability of the results, the dynamic character of the test and its low invasiveness, further studies about the use of transcutaneous fluorometric measurement of ICG elimination in dogs are worthwhile.

VIII Literaturverzeichnis

Adam FH, German AJ, McConnell JF, Trehy MR, Whitley N, Collings A, Watson PJ, Burrow RD (2012): Clinical and clinicopathologic abnormalities in young dogs with acquired and congenital portosystemic shunts: 93 cases (2003–2008). *J Am Vet Med Assoc* 241: 760–765.

Akhavan A, Lingappa VR (2007): Protein synthesis and degradation in the liver. In: Rods J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M (Hrsg.), *Textbook of Hepatology*. Blackwell Publishing Ltd Third Edition, Oxford, UK, 192–199.

Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, Pätälä T, Spillmann T, Tuchin VV, Venermo M, Välisuo P (2012): A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *Int J Biomed Imaging* 2012: 1–26.

Alvarez L, Whittemore JC (2009): Liver enzyme elevations in dogs: diagnostic approach. *Compend Contin Educ Vet* 31: 416–+.

Aronson LR, Gacad RC, Kaminsky-Russ K, Gregory CR, Mullen KD (1997): Endogenous Benzodiazepine Activity in the Peripheral and Portal Blood of Dogs With Congenital Portosystemic Shunts. *Vet Surgery* 26: 189–194.

Badylak SF, Dodds WJ, Van Vleet, J F (1983): Plasma coagulation factor abnormalities in dogs with naturally occurring hepatic disease. *Am J Vet Res* 44: 2336–2340.

Balkman CE, Center SA, Randolph JF, Trainor D, Warner KL, Crawford MA, Adachi K, Erb HN (2003): Evaluation of urine sulfated and nonsulfated bile acids as a diagnostic test for liver disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1368–1375.

Bartels A, Martin V, Bidoli E, Steigmeier-Raith S, Brühshwein A, Reese S, Köstlin R, Erhard M (2015): Brachycephalic problems of pugs relevant to animal welfare. *Anim Welf* 24: 327–333.

Bauer NB, Schneider MA, Neiger R, Moritz A (2006): Liver disease in dogs with tracheal collapse. *J Vet Intern Med* 20: 845–849.

Bäumler W, Paasch U, Klein A, Landthaler M, Friedman R, Shafirstein G (2013): Intravenous injection of indocyanine green to enhance laser-assisted coagulation of blood vessels in skin - an animal study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27: e206-e211.

Benson RC, Kues HA (1978): Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys Med Biol* 23: 159–163.

Benya R, Quintana J, Brundage B (1989): Adverse reactions to indocyanine green: A case report and a review of the literature. *Cathet Cardiovasc Diagn* 17: 231–233.

Berent AC, Weisse C (2007): Portosystemic Shunts and Portal Venous Hypoplasia. Compendium's standards of care. Emergency and critical care medicine 9: 1–11.

Berent AC, Weisse C (2010): Hepatic Vascular Anomalies. In: Ettinger SJ, Feldman EC (Hrsg.), Textbook of Veterinary Internal Medicine. Elsevier Health Sciences 7th ed, London, 1649–1672.

Bergstra A, Hoendermis ES, Talsma MD, Mook GA, Zijlstra WG, Berger RM (2009): Pulse Densitometer Indocyanine Green Dilution Curves: A Simple Applicable and Accurate Method for Determination of Cardiac Shunts. Congenit Heart Dis 4: 362–368.

Bexfield NH, Andres-Abdo C, Scase TJ, Constantino-Casas F, Watson PJ (2011): Chronic hepatitis in the English springer spaniel: clinical presentation, histological description and outcome. Vet Rec 169: 415.

Boothe DM, Cullen JM, Calvin JA, Jenkins WL, Brown SA, Green RA, Corrier DE (1994): Antipyrine and caffeine dispositions in clinically normal dogs and dogs with progressive liver disease. Am J Vet Res 55: 254–261.

Bosje JT, Bunch SE, van den Brom, W., Rothuizen J (2005): Plasma 14C-cholic acid clearance in healthy dogs and dogs with cholestasis or a congenital portosystemic shunt. Vet Rec 157: 109–112.

Bostwick DR, Twedt DC (1995): Intrahepatic and extrahepatic portal venous anomalies in dogs: 52 cases (1982-1992). J Am Vet Med Assoc 206: 1181–1185.

Boyd JW (1988): Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. J Comp Pathol 98: 381–404.

Bradley EC, Barr JW (1968): Determination of blood volume using indocyanine green (Cardio-Green) dye. Life Sci 7: 1001–1007.

Bridger N, Glanemann B, Neiger R (2008): Comparison of Postprandial and Ceruletide Serum Bile Acid Stimulation in Dogs. J Vet Intern Med 22: 873–878.

Broome CJ, Walsh VP, Braddock JA (2004): Congenital portosystemic shunts in dogs and cats. N Z Vet J 52: 154–162.

Bunch SE, Jordan HL, Sellon RK, Cullen JM, Smith JE (1995): Characterization of iron status in young dogs with portosystemic shunt. Am J Vet Res 56: 853–858.

Buob S, Johnston A, Webster C (2011): Portal Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. J Vet Intern Med 25: 169–186.

Burns E, Triger DR, Tucker GT, Bax, N. D. S. (1991): Indocyanine Green elimination in patients with liver disease and in normal subjects. Clin Sci (Lond) 80: 155–160.

Caporali, EHG, Phillips H, Underwood L, Selmic LE (2015): Risk factors for urolithiasis in dogs with congenital extrahepatic portosystemic shunts: 95 cases (1999–2013). *J Am Vet Med Assoc* 246: 530–536.

Center SA (1990): Liver function tests in the diagnosis of portosystemic vascular anomalies. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 5: 94–99.

Center SA (1996): Diagnostic procedures for evaluation of hepatic disease. In: Guilford WG, Center SA, Strombeck DR, Williams DA, Meyer D (Hrsg.), *Strombeck's small animal gastroenterology*. Saunders 3rd ed, Philadelphia, 133–188.

Center SA (1998): Nutritional support for dogs and cats with hepatobiliary disease. *J Nutr* 128: 2733S-2746S.

Center SA, Baldwin BH, Erb H, Tennant BC (1985a): Bile acid concentrations in the diagnosis of hepatobiliary disease in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 187: 935–940.

Center SA, Baldwin BH, Lahunta A de, Dietze AE, Tennant BC (1985b): Evaluation of serum bile acid concentrations for the diagnosis of portosystemic venous anomalies in the dog and cat. *J Am Vet Med Assoc* 186: 1090–1094.

Center SA, Bunch SE, Baldwin BH, Hornbuckle WE, Tennant BC (1983): Comparison of sulfobromophthalein and indocyanine green clearances in the dog. *Am J Vet Res* 44: 722–726.

Center SA, Magne ML (1990): Historical, Physical Examination, and Clinicopathologic Features of Portosystemic Vascular Anomalies in the Dog and Cat. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 5: 83–93.

Center SA, ManWarren T, Slater MR, Wilentz E (1991): Evaluation of twelve-hour preprandial and two-hour postprandial serum bile acids concentrations for diagnosis of hepatobiliary disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 199: 217–226.

Cerón JJ, Eckersall, Peter David, Martínez-Subiela S (2005): Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 34: 85–99.

Chen CY, Fancher RM, Ruan Q, Marathe P, Rodrigues AD, Yang Z (2008): A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of indocyanine green in dog plasma and bile. *J Pharm Biomed Anal* 47: 351–359.

Cheng X-P, Zhao J, Chen Y, Meng F-K, Xu B, Yu H-W, Meng Q-H, Liu Y-M, Zhang S-B, Meng S, Zhang J-Y, Zhang J-Y, Duan Z-P, Zheng S-J (2016): Comparison of the ability of the PDD-ICG clearance test, CTP, MELD, and MELD-Na to predict short-term and medium-term mortality in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*: 1.

Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS (1960): Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 39: 592–600.

Cheung TT, Chan SC, Chok KSH, Chan ACY, Yu WC, Poon RTP, Lo CM, Fan ST (2012): Rapid measurement of indocyanine green retention by pulse spectrophotometry: a validation study in 70 patients with Child-Pugh A cirrhosis before hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 11: 267–271.

Chiaramonte D, Steiner JM, Broussard JD, Baer K, Gumminger S, Moeller EM, Williams DA, Shumway R (2003): Use of a ¹³C-aminopyrine blood test: first clinical impressions. *Can J Vet Res* 67: 183–188.

Chijiwa AMJU (2002): Relation of Biliary Bile Acid Output to Hepatic Adenosine Triphosphate Level and Biliary Indocyanine Green Excretion in Humans. *World J Surg* 26: 457–461.

Clements D, West R, Elias E (1987): Comparison of bolus and infusion methods for estimating hepatic blood flow in patients with liver disease using indocyanine green. *J Hepatol* 5: 282–287.

Collings AJ, Gow AG, Marques A, Yool D, Furneaux R, Mellanby R, Watson PJ (2012): A prospective study of basal insulin concentrations in dogs with congenital portosystemic shunts. *J Small Anim Pract* 53: 228–233.

Cooke AR, Harrison DD, Skyring AP (1963): Use of indocyanine green as a test of liver function. *Am J Dig Dis* 8: 244–250.

Cooper J, Webster CRL (2006): Acute liver failure. *Compend Contin Educ Vet* 28: 498-+.

Cullen JM, van den Ingh TSGAM, Bunch SE, Rothuizen J, Washabau RJ, Desmet VJ (2006): Morphological classification of circulatory disorders of the canine and feline liver. In: Rothuizen J, Bunch SE, Charles JA (Hrsg.), *WSAVA standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver diseases*. Saunders Elsevier 1. publ, Edinburgh u.a, 41–59.

d'Anjou M-A (2007): The Sonographic Search for Portosystemic Shunts. *Clin Tech Small Anim Pract* 22: 104–114.

Daneshmend TK, Jackson L, Roberts CJ (1981): Physiological and pharmacological variability in estimated hepatic blood flow in man. *Br J Clin Pharmacol* 11: 491–496.

d'Anjou M-A, Penninck D, Cornejo L, Pibarot P (2004): Ultrasonographic diagnosis of portosystemic shunting in dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound* 45: 424–437.

de Liguori Carino N, O'Reilly DA, Dajani K, Ghaneh P, Poston GJ, Wu AV (2009): Perioperative use of the LiMON method of indocyanine green elimination measurement for the prediction and early detection of post-hepatectomy liver failure. *Eur J Surg Oncol* 35: 957–962.

Dereszynski DM, Center SA, Randolph JF, Brooks MB, Hadden AG, Palyada KS, McDonough SP, Messick J, Stokol T, Bischoff KL, Gluckman S, Sanders SY (2008): Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005–2006). *J Am Vet Med Assoc* 232: 1329–1337.

Desmettre T, Devoisselle J, Mordon S (2000): Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Surv Ophthalmol* 45: 15–27.

Dorr MB, Pollack GM (1989): Specific Assay for the Quantitation of Indocyanine Green in Rat Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J Pharm Sci* 78: 328–333.

Dorshow RB, Bugaj JE, Burleigh BD, Duncan JR, Johnson MA, Jones WB (1998): Noninvasive fluorescence detection of hepatic and renal function. *J Biomed Opt* 3: 340–345.

Dunayer EK, Gwaltney-Brant SM (2006): Acute hepatic failure and coagulopathy associated with xylitol ingestion in eight dogs. *J Am Vet Med Assoc* 229: 1113–1117.

Elhiblu MA, Dua K, Mohindroo J, Mahajan SK, Sood NK, Dhaliwal PS (2015): Clinico-hemato-biochemical profile of dogs with liver cirrhosis. *Vet World* 8: 487–491.

Ellery SJ, Cai X, Walker DD, Dickinson H, Kett MM (2015): Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate in small rodents: Through the skin for the win? *Nephrology (Carlton)* 20: 117–123.

Faybik P, Hetz H (2006): Plasma Disappearance Rate of Indocyanine Green in Liver Dysfunction. *Transplant Proc* 38: 801–802.

Faybik P, Krenn C-G, Baker A, Lahner D, Berlakovich G, Steltzer H, Hetz H (2004): Comparison of invasive and noninvasive measurement of plasma disappearance rate of indocyanine green in patients undergoing liver transplantation: A prospective investigator-blinded study. *Liver Transpl* 10: 1060–1064.

Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (2002): Hepatic encephalopathy—Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35: 716–721.

Ferguson D, Crowe M, McLaughlin L, Gaschen F (2011): Survival and Prognostic Indicators for Cycad Intoxication in Dogs. *J Vet Intern Med* 25: 831–837.

Fieten H, Penning LC, Leegwater PA, Rothuizen J (2014): New canine models of copper toxicosis: diagnosis, treatment, and genetics. *Ann N Y Acad Sci* 1314: 42–48.

Francavilla A, Jones AF, Benichou J, Starzl TE (1980): The effect of portacaval shunt upon hepatic cholesterol synthesis and cyclic AMP in dogs and baboons. *J Surg Res* 28: 1–7.

Francavilla A, Starzl TE, Porter K, Foglieni CS, Michalopoulos GK, Carrieri G, Trejo J, Azzarone A, Barone M, Zeng QH (1991): Screening for candidate hepatic growth factors by selective portal infusion after canine Eck's fistula. *Hepatology* 14: 665–670.

Frankel D, Seim H, MacPhail C, Monnet E (2006): Evaluation of cellophane banding with and without intraoperative attenuation for treatment of congenital extrahepatic portosystemic shunts in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 228: 1355–1360.

Fuentealba C, Guest S, Haywood S, Horney B (1997): Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. *Can Vet J* 38: 365–373.

Fyfe JC, Hemker SL, Venta PJ, Stebbing B, Giger U (2014): Selective Intestinal Cobalamin Malabsorption with Proteinuria (Imlerslund-Gräsbeck Syndrome) in Juvenile Beagles. *J Vet Intern Med* 28: 356–362.

Gathje J, Steuer RR, Nicholes KR (1970): Stability studies on indocyanine green dye. *J Appl Physiol* 29: 181–185.

Gerritzen-Bruning MJ, van den Ingh TSGAM, Rothuizen J (2006): Diagnostic Value of Fasting Plasma Ammonia and Bile Acid Concentrations in the Identification of Portosystemic Shunting in Dogs. *J Vet Intern Med* 20: 13–19.

Goettsch E, Lytle JD, Grim WM, Dunbar P (1942): Amino acid studies I. Plasma amino acid retention in the hypoproteinemic dog as evidence of impaired liver function. *J Biol Chem* 144: 121–134.

Goggs R, Serrano S, Szladovits B, Keir I, Ong R, Hughes D (2008): Clinical investigation of a point-of-care blood ammonia analyzer. *Vet Clin Pathol* 37: 198–206.

Golden DL, Spano JS, Wilson RC, DeGraves FJ, Whatley EM (1994): Application of an enzyme-multiplied immunoassay technique for determination of caffeine elimination kinetics as a test of liver function in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 55: 790–794.

Gomez Selgas A, Bexfield N, Scase TJ, Holmes MA, Watson P (2014): Total serum bilirubin as a negative prognostic factor in idiopathic canine chronic hepatitis. *J Vet Diagn Invest* 26: 246–251.

Gow AG, Marques AI, Yool DA, Crawford K, Warman SM, Eckersall PD, Jalan R, Mellanby RJ (2012): Dogs with congenital porto-systemic shunting (cPSS) and hepatic encephalopathy have higher serum concentrations of C-reactive protein than asymptomatic dogs with cPSS. *Metab Brain Dis* 27: 227–229.

Graaf W de, Häusler S, Heger M, van Ginhoven, Tessa M., van Cappellen G, Bennink RJ, Kullak-Ublick GA, Hesselmann R, van Gulik, Thomas M., Stieger B (2011): Transporters involved in the hepatic uptake of ^{99m}Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J Hepatol* 54: 738–745.

- Greenhalgh SN, Reeve JA, Johnstone T, Goodfellow MR, Dunning MD, O'Neill EJ, Hall EJ, Watson PJ, Jeffery ND (2014):** Long-term survival and quality of life in dogs with clinical signs associated with a congenital portosystemic shunt after surgical or medical treatment. *J Am Vet Med Assoc* 245: 527–533.
- Grevel V, Schmidt S, Lettow E, Suter PF, Schmidt GU (1987a):** Der angeborene portosystemische Shunt bei Hund und Katze. Teil 1. *Tierarztl Prax* 15: 77–92.
- Grevel V, Schmidt S, Lettow E, Suter PF, Schmidt GU (1987b):** Der angeborene portosystemische Shunt bei Hund und Katze. Teil 2. *Tierarztl Prax* 15: 185–194.
- Grobelna AP, Honkavaara J, Restitutti F, Huuskonen V, Sakka SG, Spillmann T (2016):** Evaluation of a transcutaneous method to assess canine liver function by indocyanine green plasma disappearance rate in healthy adult Beagle dogs. *Vet J* 209: 169–173.
- Haers H, Paepe D, Vermote K, Saunders JH, Daminet S, Risselada M (2007a):** Portosystemic shunts in dogs and cats: Imaging portosystemic shunts in small animals - Hepatic vascular anatomy, shunt morphology, radiography. *Vlaams Diergeneeskdt Tijdschr* 72: 315–321.
- Haers H, Paepe D, Vermote K, Saunders JH, Daminet S, Risselada M (2007b):** Portosystemic shunts in dogs and cats: imaging portosystemic shunts in small animals – ultrasonography, nuclear scintigraphy, computed tomography, magnetic resonance imaging. *Vlaams Diergeneeskdt Tijdschr* 72: 322–330.
- Halle BM, Poulsen TD, Pedersen HP (2014):** Indocyanine green plasma disappearance rate as dynamic liver function test in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 58: 1214–1219.
- Harari J, Lincoln J, Alexander J, Miller J (1990):** Lateral thoracotomy and cellophane handling of a congenital portoazygous shunt in a dog. *J Small Anim Pract* 31: 571–573.
- Haruna M, Kumon K, Yahagi N, Watanabe Y, Ishida Y, Kobayashi N, Aoyagi T (1998):** Blood volume measurement at the bedside using ICG pulse spectrophotometry. *Anesthesiology* 89: 1322–1328.
- Hashimoto M, Watanabe G (2000):** Hepatic Parenchymal Cell Volume and the Indocyanine Green Tolerance Test. *J Surg Res* 92: 222–227.
- Häussinger D (2007):** Ammonia, urea production and pH regulation. In: Rods J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M (Hrsg.), *Textbook of Hepatology*. Blackwell Publishing Ltd Third Edition, Oxford, UK, 181–192.
- Hetz H, Faybik P, Berlakovich G, Baker A, Bacher A, Burghuber C, Sandner SE, Steltzer H, Krenn CG (2006):** Molecular adsorbent recirculating system in patients with early allograft dysfunction after liver transplantation: A pilot study. *Liver Transpl* 12: 1357–1364.

Hoareau GL, Jourdan G, Mellema M, Verwaerde P (2012): Evaluation of arterial blood gases and arterial blood pressures in brachycephalic dogs. *J Vet Intern Med* 26: 897–904.

Hoeft A, Schorn B, Weyland A, Scholz M, Buhre W, Stepanek E, Allen SJ, Sonntag H (1994): Bedside assessment of intravascular volume status in patients undergoing coronary bypass surgery. *Anesthesiology* 81: 76–86.

Holford AL, Tobias KM, Bartges JW, Johnson BM (2008): Adrenal Response to Adrenocorticotrophic Hormone in Dogs before and after Surgical Attenuation of a Single Congenital Portosystemic Shunt. *J Vet Intern Med* 22: 832–838.

Holm C, Tegeler J, Mayr M, Becker A, Pfeiffer UJ, Mühlbauer W (2002): Monitoring free flaps using laser-induced fluorescence of indocyanine green: A preliminary experience. *Microsurgery* 22: 278–287.

Hori T, Iida T, Yagi S, Taniguchi K, Yamamoto C, Mizuno S, Yamagiwa K, Isaji S, Uemoto S (2006): KICG value, a reliable real-time estimator of graft function, accurately predicts outcomes in adult living-donor liver transplantation. *Liver Transpl* 12: 605–613.

House RA (2010): Increased blood ammonia concentration after generalized seizures in dogs. *J Vet Intern Med* 26: 696.

Hsieh C-B, Chen C-J, Chen T-W, Yu J-C, Shen K-L, Chang T-M, Liu Y-C (2004): Accuracy of indocyanine green pulse spectrophotometry clearance test for liver function prediction in transplanted patients. *World J Gastroenterol* 10: 2394–2396.

Huber W, Kranzmayr M, Schultheiss C, Reindl W, Krug A, Saugel B, Mayr U, Schmid RM (2013): Indocyanine green plasma disappearance rate for assessment of liver function: re-evaluation of normal ranges and impact of biometric data. *Crit Care* 17: P178.

Hunt GB (2004): Effect of breed on anatomy of portosystemic shunts resulting from congenital diseases in dogs and cats: a review of 242 cases. *Australian Vet J* 82: 746–749.

Hunt GB, Hughes J (1999): Outcomes after extrahepatic portosystemic shunt ligation in 49 dogs. *Australian Vet J* 77: 303–307.

Hunt GB, Kummeling A, Tisdall PL, Marchevsky AM, Liptak JM, Youmans KR, Goldsmit SE, Beck JA (2004): Outcomes of Cellophane Banding for Congenital Portosystemic Shunts in 106 Dogs and 5 Cats. *Vet Surgery* 33: 25–31.

Hurn SD, Edwards GA (2003): Perioperative outcomes after three different single extrahepatic portosystemic shunt attenuation techniques in dogs: partial ligation, complete ligation and ameroid constrictor placement. *Australian Vet J* 81: 666–670.

Ishigami Y, Masuzawa M, Miyoshi E, Kato M, Tamura K, Kanda M, Awazu K, Taniguchi K, Kurita M, Hayashi N, Kawano S, Fusamoto H, Kamada T (1993): Clinical applications of ICG Finger Monitor in patients with liver disease. *J Hepatol* 19: 232–240.

- Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N (2009):** Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 115: 2491–2504.
- Jansen PLM, Faber KN (2007):** Metabolism of bile acids. In: Rods J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M (Hrsg.), *Textbook of Hepatology*. Blackwell Publishing Ltd Third Edition, Oxford, UK.
- Jensen AL (1991):** Evaluation of Fasting and Postprandial Total Serum Bile Acid Concentration in Dogs with Hepatobiliary Disorders. *Zentralbl Veterinarmed A* 38: 247–254.
- Johnson CA, Armstrong PJ, Hauptman JG (1987):** Congenital portosystemic shunts in dogs: 46 cases (1979-1986). *J Am Vet Med Assoc* 119: 1478–1483.
- Johnson SE, Rogers WA, Bonagura JD, Caldwell JH (1985):** Determination of serum bile acids in fasting dogs with hepatobiliary disease. *Am J Vet Res* 46: 2048–2053.
- Jones EA, Mullen KD (2012):** Theories of the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis* 16: 7–26.
- Kalbantner K, Meyer-Lindenberg A, Mischke R (2011):** Platelet function in dogs with congenital portosystemic shunt. *Vet J* 188: 189–192.
- Kavanagh C, Shaw S, Webster CRL (2011):** Coagulation in hepatobiliary disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 21: 589–604.
- Kawasaki S, Umekita N, Beppu T, Wada T, Sugiyama Y, Iga T, Hanano M (1984):** Hepatic transport of indocyanine green in dogs chronically intoxicated with dimethylnitrosamine. *Toxicol Appl Pharmacol* 75: 309–317.
- Keller E, Wolf M, Martin M, Yonekawa Y (2001):** Estimation of Cerebral Oxygenation and Hemodynamics in Cerebral Vasospasm Using Indocyaninegreen Dye Dilution and Near Infrared Spectroscopy: A Case Report. *J Neurosurg Anesthesiol* 2001: 43–48.
- Kelley D, Lester C, DeLaforcade A, Webster C (2013):** Thromboelastographic Evaluation of Dogs with Congenital Portosystemic Shunts. *J Vet Intern Med* 27: 1262–1267.
- Kelley D, Lester C, Shaw S, Laforcade A de, Webster C (2015):** Thromboelastographic Evaluation of Dogs with Acute Liver Disease. *J Vet Intern Med* 29: 1053–1062.
- Kerr MG, van Doorn T (1999):** Mass screening of Irish wolfhound puppies for portosystemic shunts by the dynamic bile acid test. *Vet Rec* 144: 693–696.
- Ketterer SG, Wiegand BD, Rapaport E (1960):** Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green and its use in estimation of hepatic blood flow in dogs. *Am J Physiol* 199: 481–484.

Kilpatrick S, Gow AG, Foale RD, Tappin SW, Carruthers H, Reed N, Yool DA, Woods S, Marques AI, Jalan R, Mellanby RJ (2014): Plasma cytokine concentrations in dogs with a congenital portosystemic shunt. *Vet J* 200: 197–199.

Kimura S, Yoshioka T, Shibuya M, Sakano T, Tanaka R, Matsuyama S (2001): Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival. *Crit Care Med* 29: 1159–1163.

Klaassen CD, Plaa GL (1969): Plasma disappearance and biliary excretion of indocyanine green in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 15: 374–384.

Kland K (2011): Evaluation der ICG-Clearance (LIMON®) zur Diagnostik von Leberfunktionsstörungen bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Dissertation.

Kleiter M, Henninger W, Hirt R, Lorinson D (1999): Portosystemischer Shunt bei einem Hund - Diagnosestellung mit Hilfe der Computertomographie. *Wien Tierarztl Monatsschr* 86: 64–70.

Kummeling A, Teske E, Rothuizen J, Van Sluijs, Frederik J (2006): Coagulation profiles in dogs with congenital portosystemic shunts before and after surgical attenuation. *J Vet Intern Med* 20: 1319–1326.

Laflamme DP, Mahaffey EA, Allen SW, Twedt DC, Prasse KW, Huber TL (1994): Microcytosis and Iron Status in Dogs With Surgically Induced Portosystemic Shunts. *J Vet Intern Med* 8: 212–216.

Lamb CR (1996): Ultrasonographic diagnosis of congenital portosystemic shunts in dogs: results of a prospective study. *Vet Radiol Ultrasound* 37: 281–288.

Landsman ML, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG (1976): Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol* 40: 575–583.

Lau H, Man K, Fan ST, Yu WC, Lo CM, Wong J (1997): Evaluation of preoperative hepatic function in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Br J Surg* 84: 1255–1259.

Lee WM, Stravitz RT, Larson AM (2012): Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases position paper on acute liver failure 2011. *Hepatology* 55: 965–967.

Leevy CM, Bender J, Silverberg M, Naylor J (1963): Physiology of dye extraction by the liver: Comparative studies of sulfobromophthalein and indocyanine green. *Ann N Y Acad Sci* 111: 161–175.

Leevy CM, Smith F, Longueville J, Paumgartner G, Howard MM (1967): Indocyanine Green Clearance as a Test for Hepatic Function. Evaluation by Dichromatic Ear Densitometry. JAMA 200: 236–240.

Levesque E, Martin E, Dudau D, Lim C, Dhonneur G, Azoulay D (2016): Current use and perspective of indocyanine green clearance in liver diseases. Anaesth Crit Care Pain Med 35: 49–57.

Lidbury JA, Ivanek R, Suchodolski JS, Steiner JM (2015): Putative precipitating factors for hepatic encephalopathy in dogs: 118 cases (1991–2014). J Am Vet Med Assoc 247: 176–183.

Lisotti A, Azzaroli F, Buonfiglioli F, Montagnani M, Cecinato P, Turco L, Calvanese C, Simoni P, Guardigli M, Arena R, Cucchetti A, Colecchia A, Festi D, Golfieri R, Mazzella G (2014): Indocyanine green retention test as a noninvasive marker of portal hypertension and esophageal varices in compensated liver cirrhosis. Hepatology 59: 643–650.

Lunn KF, James KM (2007): Normal and abnormal water balance: polyuria and polydipsia. Compend Contin Educ Vet 29: 612–624.

Malbrain ML, Viaene D, Kortgen A, laet I de, Dits H, van Regenmortel N, Schoonheydt K, Bauer M (2012): Relationship between intra-abdominal pressure and indocyanine green plasma disappearance rate: hepatic perfusion may be impaired in critically ill patients with intra-abdominal hypertension. Ann Intensive Care 2: S19.

March C, Adams MH, Garnett W, Karnes HT (1994): Stability of indocyanine green in human serum stored at -20 and -70 degrees C. Ther Drug Monit 16: 588–591.

Mathie RT, Leibermann DP, Harper AM, Blumgart LH (1979): The role of blood flow in the control of liver size. J Surg Res 27: 139–144.

Maxwell A, Hurley K, Burton C, Batt R, Camacho-Hübner C (2000): Reduced Serum Insulin-Like Growth Factor (IGF) and IGF-Binding Protein-3 Concentrations in Two Deerhounds with Congenital Portosystemic Shunts. J Vet Intern Med 14: 542–545.

Mehl ML, Kyles AE, Hardie EM, Kass PH, Adin CA, Flynn AK, De Cock HE, Gregory CR (2005): Evaluation of ameroid ring constrictors for treatment for single extrahepatic portosystemic shunts in dogs: 168 cases (1995-2001). J Am Vet Med Assoc 226: 2020–2030.

Merle U, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Eisenbach C (2009): Sensitivity and specificity of plasma disappearance rate of indocyanine green as a prognostic indicator in acute liver failure. BMC Gastroenterol 9: 947–953.

Meyer DJ, Harvey JW (1994): Hematologic Changes Associated With Serum and Hepatic Iron Alterations in Dogs With Congenital Portosystemic Vascular Anomalies. J Vet Intern Med 8: 55–56.

- Meyer DJ, Strombeck DR, Stone EA, Zenoble RD, Buss DD (1978):** Ammonia tolerance test in clinically normal dogs and in dogs with portosystemic shunts. *J Am Vet Med Assoc* 173: 377–379.
- Meyer H, Rothuizen J, Ubbink G, van den Ingh TSGAM (1995):** Increasing incidence of hereditary intrahepatic portosystemic shunts in Irish wolfhounds in The Netherlands (1984 to 1992). *Vet Rec* 136: 13–16.
- Meyer HP, Rothuizen J (1994):** Increased free cortisol in plasma of dogs with portosystemic encephalopathy (PSE). *Domest Anim Endocrinol* 11: 317–322.
- Meyer HP, Rothuizen J, Tiemessen I, van den Brom, W. E., van den Ingh TSGAM (1996):** Transient metabolic hyperammonaemia in young Irish wolfhounds. *Vet Rec* 138: 105–107.
- Moeller EM, Steiner JM, Williams DA, Klein PD (2001):** Preliminary studies of a canine 13C-aminopyrine demethylation blood test. *Can J Vet Res* 65: 45–49.
- Moeller EM, Steiner JM, Williams DA, Tetrick M, Burr J (2004):** Kinetic analysis of demethylation of 13C-aminopyrine in healthy dogs. *Am J Vet Res* 65: 159–162.
- Muckle TJ (1976):** Plasma proteins binding of indocyanine green. *Biochem Med* 15: 17–21.
- Mwanza T, Miyamoto T, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T (1997):** Ultrasonography, biochemical and hematological profiles in liver disease caused by intravenous administration of dimethylnitrosamine in dogs. *Jpn J Vet Res* 45: 153–161.
- Neumann S (2010):** Blutparameter zur Beurteilung der Leberfunktion beim Hund. *Prakt Tierarzt* 91: 111–121.
- Neumann S (2013a):** Leber. In: Moritz A, Kraft W, Dürr UM (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, 250–275.
- Neumann S (2013b):** Serumlipide. In: Moritz A, Kraft W, Dürr UM (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, 312–318.
- Neumann S, Frenz M, Streit F, Oellerich M (2011):** Formation of monoethylglycinexylidide (MEGX) in clinically healthy dogs. *Can J Vet Res* 75: 317–320.
- Neumann S, Welling H, Thuere S (2007):** Insulin-like Growth Factor I Concentration in Dogs with Inflammatory and Neoplastic Liver Diseases. *J Vet Med Series A* 54: 612–617.
- Niles JD, Williams JM, Cripps PJ (2001):** Hemostatic profiles in 39 dogs with congenital portosystemic shunts. *Vet Surgery* 30: 97–104.
- Nxumalo JL, Teranaka M, Schenk WG (1977):** Sensitivity of indocyanine green (ICG) half-life changes relative to circulatory shock state. *J Surg Res* 23: 400–404.

O'Leary CA, Parslow A, Malik R, Hunt GB, Hurford RI, Tisdall, P. L. C., Duffy DL (2014): The inheritance of extra-hepatic portosystemic shunts and elevated bile acid concentrations in Maltese dogs. *J Small Anim Pract* 55: 14–21.

Ott P, Keiding S, Johnsen AH, Bass L (1994): Hepatic removal of two fractions of indocyanine green after bolus injection in anesthetized pigs. *Am J Physiol* 266: G1108-22.

Owczarek-Lipska M, Jagannathan V, Drögemüller C, Lutz S, Glanemann B, Leeb T, Kook PH, Wade C (2013): A Frameshift Mutation in the Cubilin Gene (CUBN) in Border Collies with Imerslund-Gräsbeck Syndrome (Selective Cobalamin Malabsorption). *PLoS One* 8: e61144.

Paepe D, Haers H, Vermote K, Saunders J, Risselada M, Daminet S (2007a): Portosystemic shunts in dogs and cats: definition, epidemiology and clinical signs of congenital portosystemic shunts. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 76: 234–240.

Paepe D, Haers H, Vermote K, Saunders J, Risselada M, Daminet S (2007b): Portosystemic shunts in dogs and cats: laboratory diagnosis of congenital portosystemic shunts. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 76: 241–248.

Paumgartner G, Huber J, Grabner G (1969): Kinetik der hepatischen Farbstoffaufnahme von Indocyaningrün. Einfluss von Bilirubin und Natriumglykocholat. *Experientia* 25: 1219–1223.

Paumgartner G, Probst P, Kraines R, Leevy CM (1970): Kinetics of indocyanine green removal from the blood. *Ann N Y Acad Sci* 170: 134–147.

Peterson ME (2013): Xylitol. *Top Companion Anim Med* 28: 18–20.

Poldervaart JH, Favier RP, Penning LC, van den Ingh, T.S.G.A.M., Rothuizen J (2009): Primary Hepatitis in Dogs: A Retrospective Review (2002-2006). *J Vet Intern Med* 23: 72–80.

Prasse KW, Bjorling DE, Holmes RA, Cornelius LM (1983): Indocyanine green clearance and ammonia tolerance in partially hepatectomized and hepatic devascularized, anesthetized dogs. *Am J Vet Res* 44: 2320–2323.

Prins M, Schellens C, van Leeuwen MW, Rothuizen J, Teske E (2010): Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *Vet J* 185: 163–168.

Proot S, Biourge V, Teske E, Rothuizen J (2009): Soy Protein Isolate versus Meat-Based Low-Protein Diet for Dogs with Congenital Portosystemic Shunts. *J Vet Intern Med* 23: 794–800.

Purcell R, Kruger P, Jones M (2006): Indocyanine green elimination: a comparison of the LiMON and serial blood sampling methods. *ANZ J Surg* 76: 75–77.

Rakich PM, Prasse KW, Bjorling DE (1987): Clearance of indocyanine green in dogs with partial hepatectomy, hepatic duct ligation, and passive hepatic congestion. *Am J Vet Res* 48: 1353–1357.

- Richter KP (2003):** Diseases of the liver and hepatobiliary system. In: Tams TR (Hrsg.), Handbook of small animal gastroenterology. Saunders 2nd ed, St. Louis, Mo, 286–352.
- Rothuizen J (2012):** Leber- und Gallengangserkrankungen, hepatobiliäre Erkrankungen. In: Niemand HG, Suter PF, Kohn B, Schwarz G (Hrsg.), Praktikum der Hundeklinik. Enke 11., überarb. u. erw. Aufl, Stuttgart, 738–766.
- Rothuizen J, Bunch SE, Charles JA (Hrsg.) (2006):** WSAVA standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver diseases. Saunders Elsevier, Edinburgh u.a.
- Rothuizen J, van den Ingh TSGAM (1982a):** Arterial and venous ammonia concentrations in the diagnosis of canine hepato-encephalopathy. Res Vet Sci 33: 17–21.
- Rothuizen J, van den Ingh TSGAM (1982b):** Rectal ammonia tolerance test in the evaluation of portal circulation in dogs with liver disease. Res Vet Sci 33: 22–25.
- Ruland K (2009):** Sensitivität und Spezifität von Serum-Ammoniak und Serum-Gallensäuren zur Diagnose portosystemischer Shunts bei Hunden und Katzen. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Tierärztliche Fakultät, Medizinische Kleintierklinik, Inaugural-Dissertation.
- Ruland K, Fischer A, Hartmann K (2010):** Sensitivity and specificity of fasting ammonia and serum bile acids in the diagnosis of portosystemic shunts in dogs and cats. Vet Clin Pathol 39: 57–64.
- Rutgers H, Haywood S, Kelly D (1993):** Idiopathic hepatic fibrosis in 15 dogs. Vet Rec 133: 115–118.
- Sakka SG (2007):** Assessing liver function. Curr Opin Crit Care 13: 207–214.
- Sakka SG, Koeck H, Meier-Hellmann A (2004):** Measurement of indocyanine green plasma disappearance rate by two different dosages. Intensive Care Med 30: 506–509.
- Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A (2000):** Comparison of invasive and noninvasive measurements of indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients with mechanical ventilation and stable hemodynamics. Intensive Care Med 26: 1553–1556.
- Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A (2002):** Prognostic Value of the Indocyanine Green Plasma Disappearance Rate in Critically Ill Patients. Chest 122: 1715–1720.
- Sakka SG, van Hout N (2006):** Relation between indocyanine green (ICG) plasma disappearance rate and ICG blood clearance in critically ill patients. Intensive Care Med 32: 766–769.
- Saxena V, Sadoqi M, Shao J (2003):** Degradation Kinetics of Indocyanine Green in Aqueous Solution. J Pharm Sci 92: 2090–2097.

Schaefer DMW, Stokol T (2015): The utility of reticulocyte indices in distinguishing iron deficiency anemia from anemia of inflammatory disease, portosystemic shunting, and breed-associated microcytosis in dogs. *Vet Clin Pathol* 44: 109–119.

Schlesinger DP, Rubin SI (1993): Serum bile acids and the assessment of hepatic function in dogs and cats. *Can Vet J* 34: 215–220.

Schneider A, Hommel G, Blettner M (2010): Linear regression analysis: part 14 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 107: 776–782.

Schock-Kusch D, Xie Q, Shulhevich Y, Hesser J, Stsepankou D, Sadick M, Koenig S, Hoecklin F, Pill J, Gretz N (2011): Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. *Kidney Int* 79: 1254–1258.

Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, Koenig S, Heinrich R, Hoecklin F, Pill J, Friedemann J, Schweda F, Gretz N, Schock-Kusch D (2012): Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F783–F788.

Schwendenwein I (2013): Serumproteine - Plasmaproteine. In: Moritz A, Kraft W, Dürr UM (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, 292–303.

Sereda CW, Adin CA (2005): Methods of Gradual Vascular Occlusion and Their Applications in Treatment of Congenital Portosystemic Shunts in Dogs: A Review. *Vet Surgery* 34: 83–91.

Sevelius E (1995): Diagnosis and prognosis of chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. *J Small Anim Pract* 36: 521–528.

Sheng Q-S, Lang R, He Q, Yang Y-J, Zhao D-F, Chen D-Z (2009): Indocyanine green clearance test and model for end-stage liver disease score of patients with liver cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8: 46–49.

Shih JL, Keating JH, Freeman LM, Webster CR (2007): Chronic Hepatitis in Labrador Retrievers: Clinical Presentation and Prognostic Factors. *J Vet Intern Med* 21: 33–39.

Shinohara H, Tanaka A, Kitai T, Yanabu N, Inomoto T, Satoh S, Hatano E, Yamaoka Y, Hirao K (1996): Direct measurement of hepatic indocyanine green clearance with near-infrared spectroscopy: separate evaluation of uptake and removal. *Hepatology* 23: 137–144.

Siedek V, Waggershauser T, Berghaus A, Matthias C (2009): Intraoperative monitoring of intraarterial paraganglioma embolization by indocyanine green fluorescence angiography. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009: 1449–1454.

Simpson KW, Meyer DJ, Boswood A, White RN, Maskell IE (1997): Iron Status and Erythrocyte Volume in Dogs With Congenital Portosystemic Vascular Anomalies. *J Vet Intern Med* 11: 14–19.

Stanton ME, Bright RM (1989): Gastroduodenal Ulceration in Dogs. Retrospective Study of 43 Cases and Literature Review. *J Vet Intern Med* 3: 238–244.

Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH, Putnam CW (1973): The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 137: 179–199.

Starzl TE, Watanabe K, Porter KA, Putnam CW (1976): Effects of insulin, glucagon, and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs. *Lancet* 307: 821–825.

Steinbach S, Krolop N, Strommer S, Herrera-Pérez Z, Geraci S, Friedemann J, Gretz N, Neiger R, Schneditz D (2014): A Pilot Study to Assess the Feasibility of Transcutaneous Glomerular Filtration Rate Measurement Using Fluorescence-Labelled Sinistrin in Dogs and Cats. *PLoS One* 9: e111734.

Steinberg JD, Olver CS (2005): Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Vet Clin Pathol* 34: 23–27.

Sterczer A, Meyer HR, Boswijk HC, Rothuizen J (1999): Evaluation of ammonia measurements in dogs with two analysers for use in veterinary practice. *Vet Rec* 144: 523–526.

Stosic A (2011): Die Embolisation des kongenitalen extrahepatischen portosystemischen Shunts beim Hund mit einem singulären Coil. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere, Inaugural-Dissertation.

Strommer S, Steinbach S, Krolop N, Herrera-Pérez Z, Gretz N, Neiger R (2015): A pilot study to assess the feasibility of transcutaneous indocyanine green clearance as liver function test in cats and dogs [abstract]. *J Vet Intern Med* 29: 463.

Suter PF (1975): Portal Vein Anomalies in the Dog: Their Angiographic Diagnosis. *Veterinary Radiology* 16: 84–97.

Swalec KM, Smeak DD (1990): Partial versus Complete Attenuation of Single Portosystemic Shunts. *Vet Surgery* 19: 406–411.

Szarmáti V, Rothuizen J (2006): Ultrasonographic identification and characterization of congenital portosystemic shunts and portal hypertensive disorders in dogs and cats. In: Rothuizen J, Bunch SE, Charles JA (Hrsg.), WSAVA standards for clinical and histological

diagnosis of canine and feline liver diseases. Saunders Elsevier 1. publ, Edinburgh u.a, 15–39.

Taboada J, Dimski DS (1995): Hepatic Encephalopathy: Clinical Signs, Pathogenesis, and Treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 25: 337–355.

Thomas MN, Weninger E, Angele M, Bösch F, Pratschke S, Andrassy J, Rentsch M, Stangl M, Hartwig W, Werner J, Guba M (2015): Intraoperative simulation of remnant liver function during anatomic liver resection with indocyanine green clearance (LiMON) measurements. *HPB (Oxford)* 17: 471–476.

Thümer O, Hüttemann E, Sakka S (2007): Indozyanin grün-Plasmaverschwinderate. Marker einer partiellen Ischämie im Hepatosplanchnikustrakt. *Anaesthesist* 56: 339–344.

Tisdall PL, Hunt GB, Bellenger CR, Malik R (1994): Congenital portosystemic shunts in Maltese and Australian cattle dogs. *Australian Vet J* 71: 174–178.

Tisdall PL, Hunt GB, Tsoukalas G, Malik R (1995): Post-prandial serum bile acid concentrations and ammonia tolerance in Maltese dogs with and without hepatic vascular anomalies. *Australian Vet J* 72: 121–126.

Tivers MS, Handel I, Gow AG, Lipscomb VJ, Jalan R, Mellanby RJ, Syn W-K (2014): Hyperammonemia and Systemic Inflammatory Response Syndrome Predicts Presence of Hepatic Encephalopathy in Dogs with Congenital Portosystemic Shunts. *PLoS One* 9: e82303.

Tobias KM (2003): Determination of Inheritance of Single Congenital Portosystemic Shunts in Yorkshire Terriers. *J Am Anim Hosp Assoc* 39: 385–389.

Tobias KM, Rohrbach BW (2003): Association of breed with the diagnosis of congenital portosystemic shunts in dogs: 2,400 cases (1980-2002). *J Am Vet Med Assoc* 223: 1636–1639.

Toens C, Krones CJ, Blum U, Fernandez V, Grommes J, Hoelzl F, Stumpf M, Klinge U, Schumpelick V (2006): Validation of IC-VIEW fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. *Int J Colorectal Dis* 21: 332–338.

Trauner M, Fickert P, Stauber RE (1999): Inflammation-induced cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 946–959.

Tsubono T, Todo S, Jabbour N, Mizoe A, Warty V, Demetris AJ, Starzl TE (1996): Indocyanine green elimination test in orthotopic liver recipients. *Hepatology* 24: 1165–1171.

Turgut K, Demir C, Ok M, Çiftçi K (1997): Pre- and Postprandial Total Serum Bile Acid Concentration Following Acute Liver Damage in Dogs. *Zentralbl Veterinarmed A* 44: 25–29.

van den Ingh TSGAM, Rothuizen J, Meyer HP (1995): Circulatory disorders of the liver in dogs and cats. *Vet Q* 17: 70–76.

van Steenbeek FG, Leegwater P, van Sluijs FJ, Heuven H, Rothuizen J (2009): Evidence of Inheritance of Intrahepatic Portosystemic Shunts in Irish Wolfhounds. *J Vet Intern Med* 23: 950–952.

van Straten G, Leegwater P, Vries M, Brom W, Rothuizen J (2005): Inherited Congenital Extrahepatic Portosystemic Shunts in Cairn Terriers. *J Vet Intern Med* 19: 321–324.

van Straten G, Spee B, Rothuizen J, van Straten M, Favier RP (2015): Diagnostic value of the rectal ammonia tolerance test, fasting plasma ammonia and fasting plasma bile acids for canine portosystemic shunting. *Vet J* 204: 282–286.

Van Winkle TJ, Bruce E (1993): Thrombosis of the portal vein in eleven dogs. *Vet Pathol* 30: 28–35.

Venema D, Stosic A, Moritz A, Schneider M (2013): Der orale Galaktosebelastungstest beim gesunden Hund [Abstract]. *Tierarztl Prax* 1: A17-A18.

Vermote K, Risselada M, Haers H, Saunders J, Paepe D, Daminet S (2007): Surgical management of congenital extrahepatic portosystemic shunts in dogs and cats. *Vlaams Diergeneeskdt Tijdschr* 76: 401–409.

Vos JJ, Wietasch, J. K. G., Absalom AR, Hendriks, H. G. D., Scheeren, T. W. L. (2014): Green light for liver function monitoring using indocyanine green? An overview of current clinical applications. *Anaesthesia* 69: 1364–1376.

Walker MC, Hill RC, Guilford WG, Scott KC, Jones GL, Buergelt CD (2001): Postprandial Venous Ammonia Concentrations in the Diagnosis of Hepatobiliary Disease in Dogs. *J Vet Intern Med* 15: 463–466.

Watson PJ (2004): Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. *Vet J* 167: 228–241.

Watson PJ, Herrtage ME (1998): Medical management of congenital portosystemic shunts in 27 dogs—a retrospective study. *J Small Anim Pract* 39: 62–68.

Weese JS, Giguere S, Guardabassi L, Morley PS, Papich M, Ricciuto DR, Sykes JE (2015): ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *J Vet Intern Med* 29: 487–498.

Weingarten MA, Sande AA (2015): Acute liver failure in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 25: 455–473.

Weisiger RA (2007): Albumin and other carrier proteins. In: Rods J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M (Hrsg.), *Textbook of Hepatology*. Blackwell Publishing Ltd Third Edition, Oxford, UK, 250–255.

Weiss M (2009): Cardiac output and systemic transit time dispersion as determinants of circulatory mixing time: a simulation study. *J Appl Physiol* 107: 445–449.

Weiss M, Krejcie TC, Avram MJ (2006): Transit time dispersion in pulmonary and systemic circulation: effects of cardiac output and solute diffusivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H861–H870.

Weiss M, Krejcie TC, Avram MJ (2011): A physiologically based model of hepatic ICG clearance: Interplay between sinusoidal uptake and biliary excretion. *Eur J Pharm Sci* 44: 359–365.

White RN, Parry AT (2015): Morphology of congenital portosystemic shunts involving the right gastric vein in dogs. *J Small Anim Pract* 56: 430–440.

Wiegand BD, Ketterer SG, Rapaport E (1960): The use of indocyanine green for the evaluation of hepatic function and blood flow in man. *Am J Dig Dis* 5: 427–436.

Winkler JT, Bohling MW, Tillson DM, Wright JC, Ballagas AJ (2003): Portosystemic Shunts: Diagnosis, Prognosis, and Treatment of 64 Cases (1993–2001). *J Am Anim Hosp Assoc* 39: 169–185.

Youmans KR, Hunt GB (1998): Cellophane banding for the gradual attenuation of single extrahepatic portosystemic shunts in eleven dogs. *Australian Vet J* 76: 531–537.

Zandvliet M, Rothuizen J (2007): Transient Hyperammonemia Due to Urea Cycle Enzyme Deficiency in Irish Wolfhounds. *J Vet Intern Med* 21: 215–218.

IX Anhang

Abbildung IX-1: Einverständniserklärung

Teilnahme an der Studie zur transkutanen Leberfunktionsmessung

– Einverständniserklärung des Patientenbesitzers –

Ziel der Studie:

Die frühzeitige Erkennung einer Leberfunktionsstörung kann sehr entscheidend für Therapie und Prognose der Erkrankung sein. Etablierte Tests zur Leberfunktionsmessung sind häufig stark abhängig von verschiedenen Faktoren (z. B. Ernährung oder Funktion anderer Organe), mit mehrfacher Blutentnahme verbunden oder sind technisch sehr empfindlich und daher nur in speziellen Einrichtungen durchführbar.

Kürzlich wurde ein Verfahren zur transkutanen Leberfunktionsmessung entwickelt: Hierbei wird eine leberspezifische Markersubstanz verabreicht und deren Abbau durch ein auf der Haut angebrachtes Gerät (transkutan) gemessen.

Diese Studie soll dazu beitragen, diese vielversprechende und stressarme Methode in der Leberfunktionsdiagnostik beim Hund zu etablieren.

Durchführung:

Im Rahmen der Voruntersuchung zum Verschluss des Lebershunts wird Ihrem Tier intravenös eine Markersubstanz injiziert. Im Anschluss wird der Abbau dieser Substanz transkutan über zwei Geräte gemessen, die nach Rasur am Brustkorb aufgebracht werden (Größe einer 1-€-Münze). Gleichzeitig erfolgen zum Vergleich mit der transkutanen Messung Blutentnahmen über einen Venenverweilkatheter. Die Messung nimmt ca. eine Stunde in Anspruch.

Im Zuge der Dreimonatskontrolle nach Verschluss des Lebershunts wird die Messung wiederholt.

Einverständniserklärung:

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass mein Hund an der oben beschriebenen Studie zur transkutanen Leberfunktionsmessung teilnimmt.

Besitzer: _____
(Name) (Vorname)

Hund: _____
(Name) (Rasse)

Gießen, den _____
(Datum)

(Unterschrift Patientenbesitzer)

Abbildung IX-2: Studienprotokoll

Transkutane Leberfunktionsmessung:
VOR/ NACH PSS-Verschluss

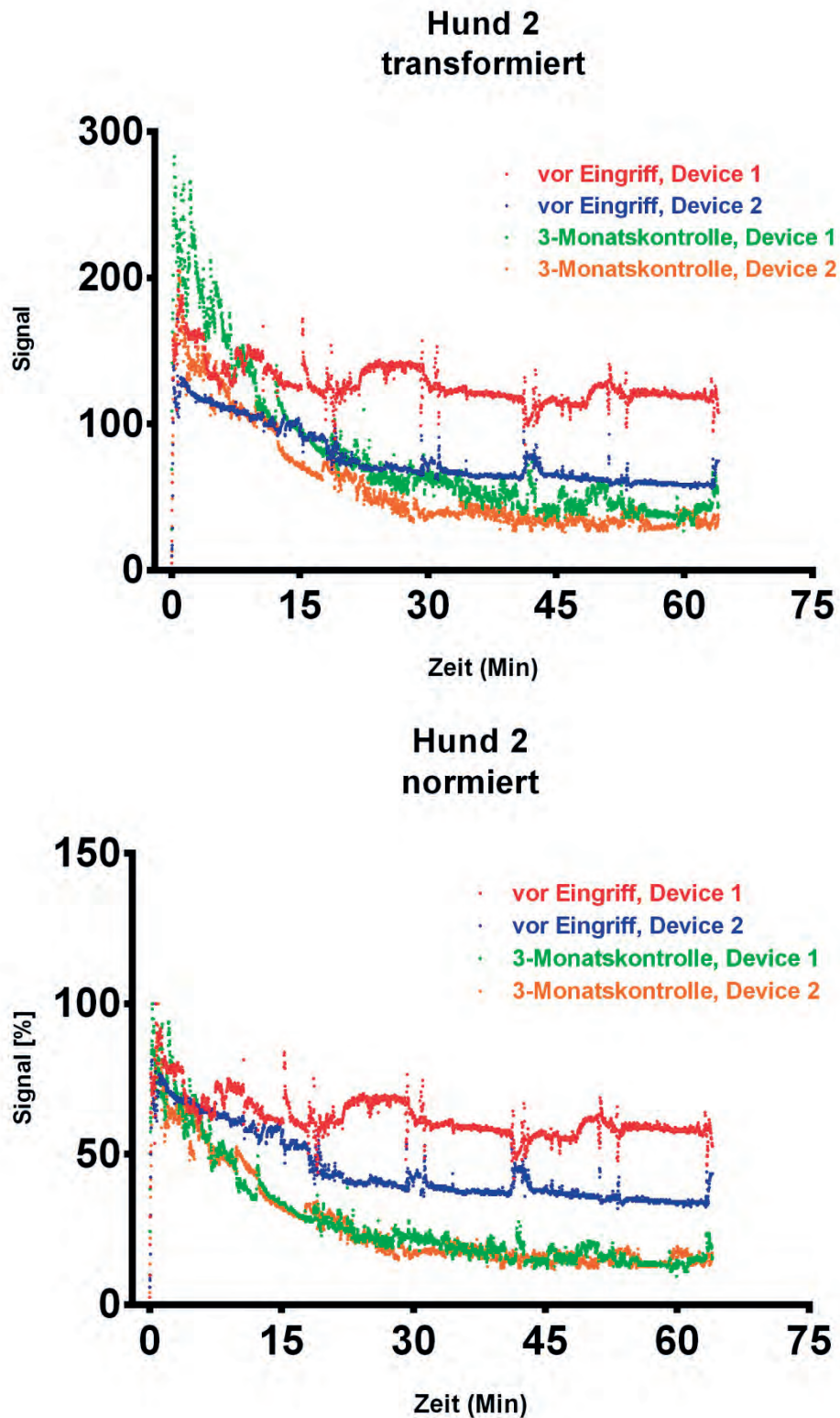
Patient: Easyvet-Nr.: Studiennummer: Datum:
Gewicht: ICG-Dosierung: 0,2 mg/kg ICG-Menge:
Mess-Venenkatheter: Injektions-Venenkatheter:
Device 1: Batterie 1: Device 2: Batterie 2:
Besonderheiten:

	Uhrzeit Device 1	Uhrzeit Device 2
Batterie konnektiert		
Aufbringen		
Start Background		
Ende Background		

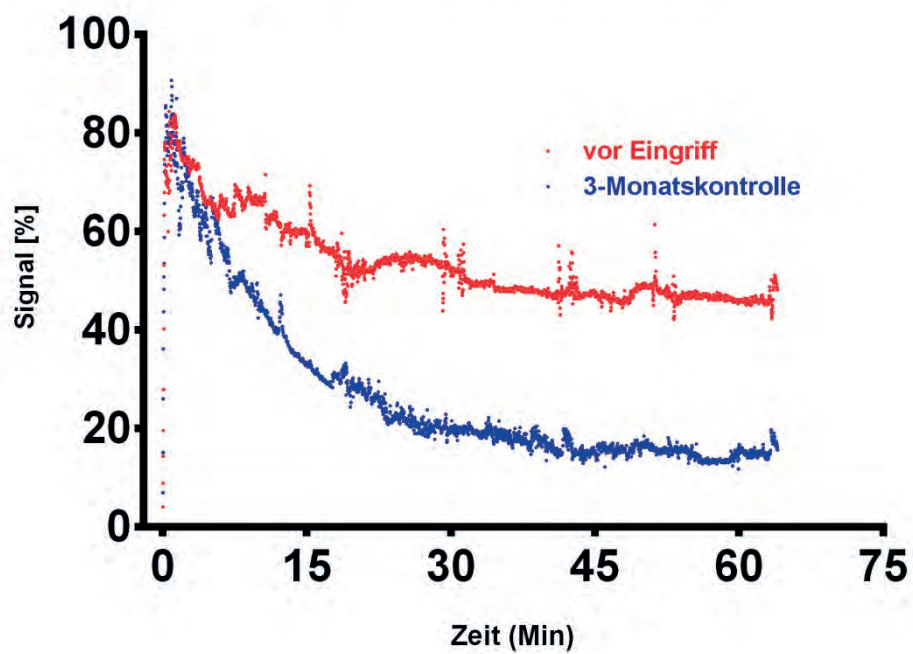
	Uhrzeit	geplante Uhrzeit	Minuten post ICG
0-Min-Wert			
ICG-Injektion			
1-Min-Wert			
3-Min-Wert			
6-Min-Wert			
9-Min-Wert			
12-Min-Wert			
18-Min-Wert			
30-Min-Wert			
42-Min-Wert			
52-Min-Wert			
64-Min-Wert			

Abbildung IX-3: Hund 2 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 2
gemittelte Eliminationskurve



Hund 2
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

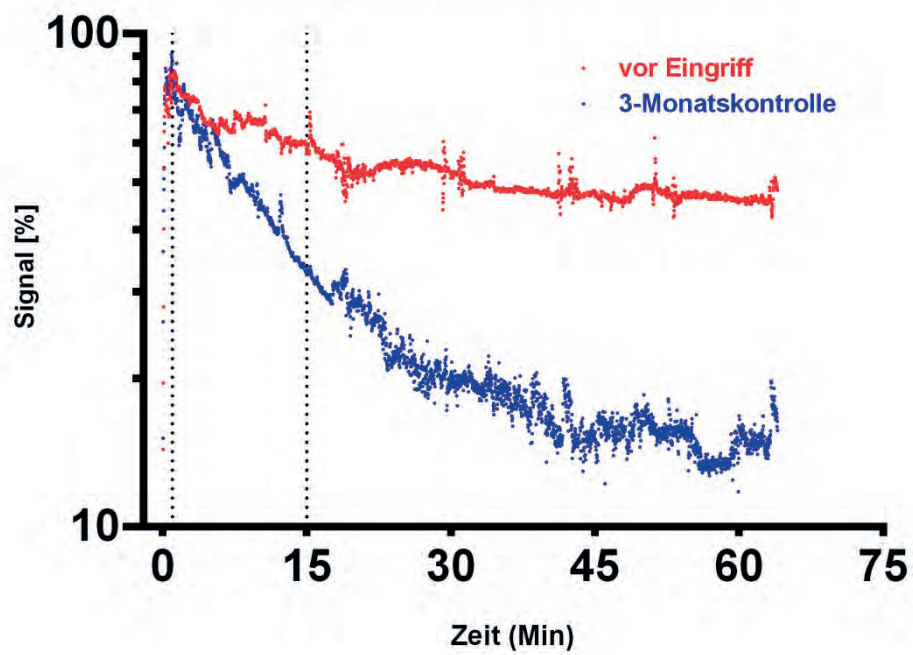
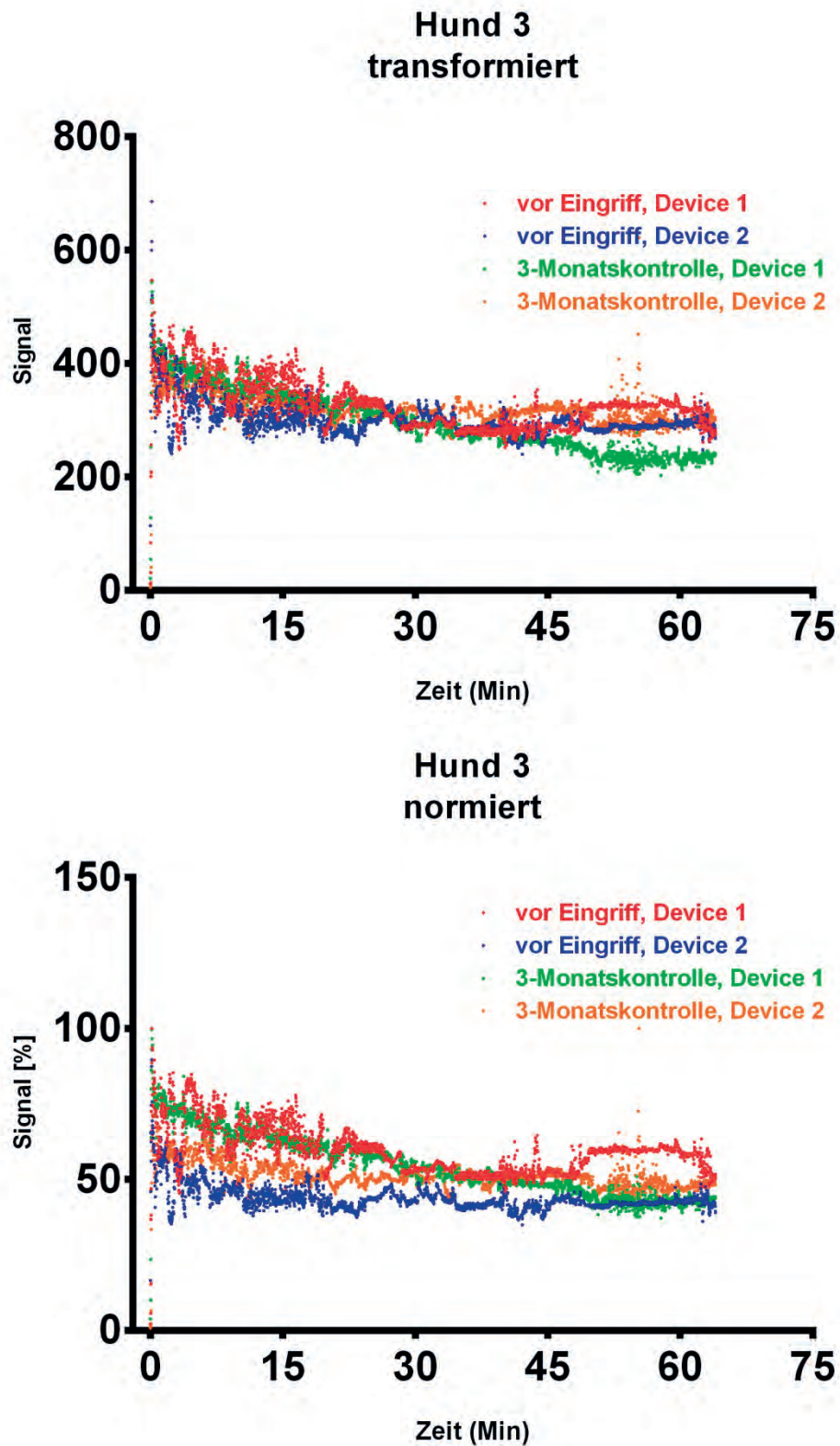
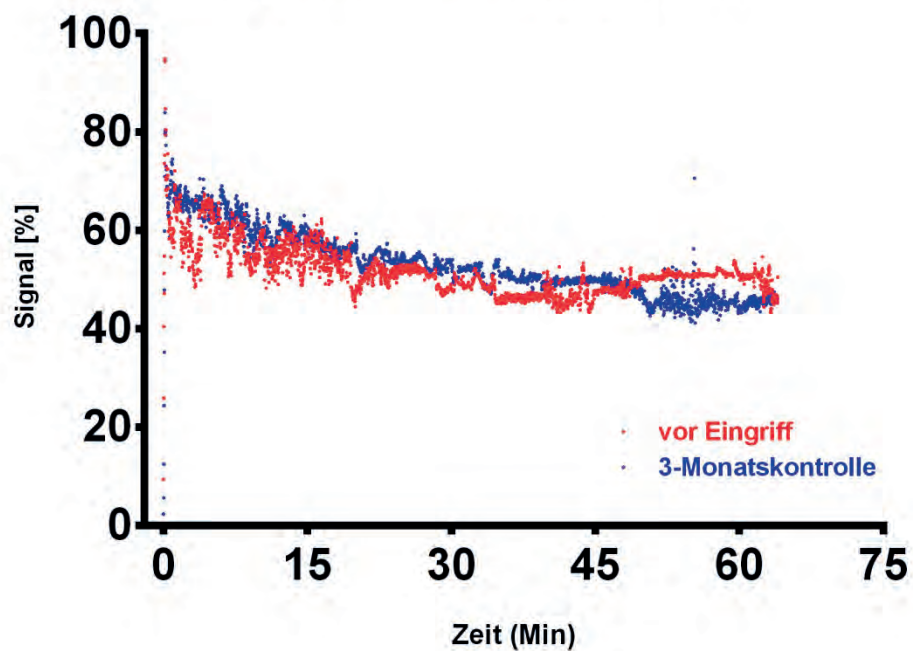


Abbildung IX-4: Hund 3 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 3
gemittelte Eliminationskurve



Hund 3
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

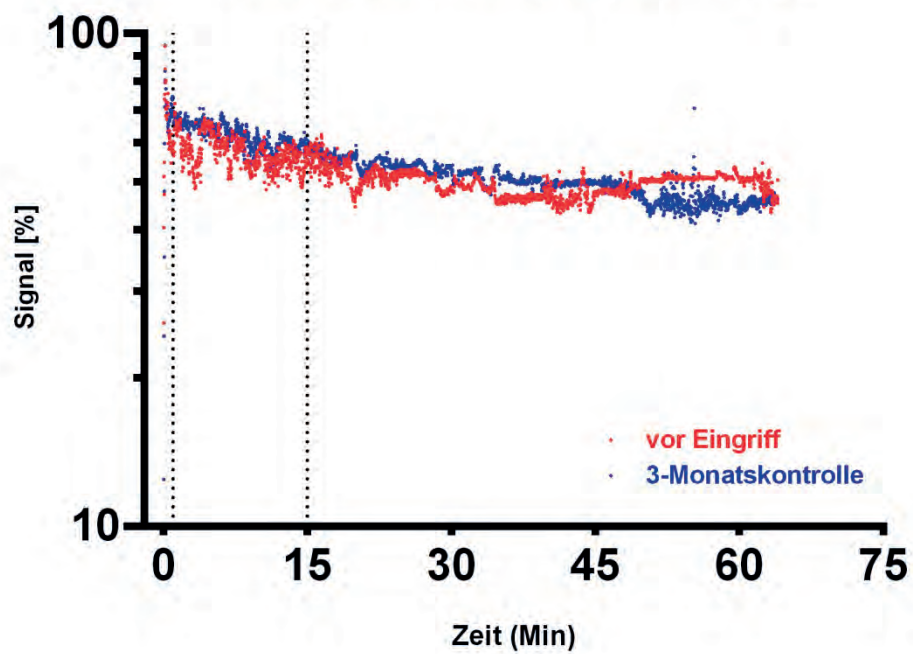
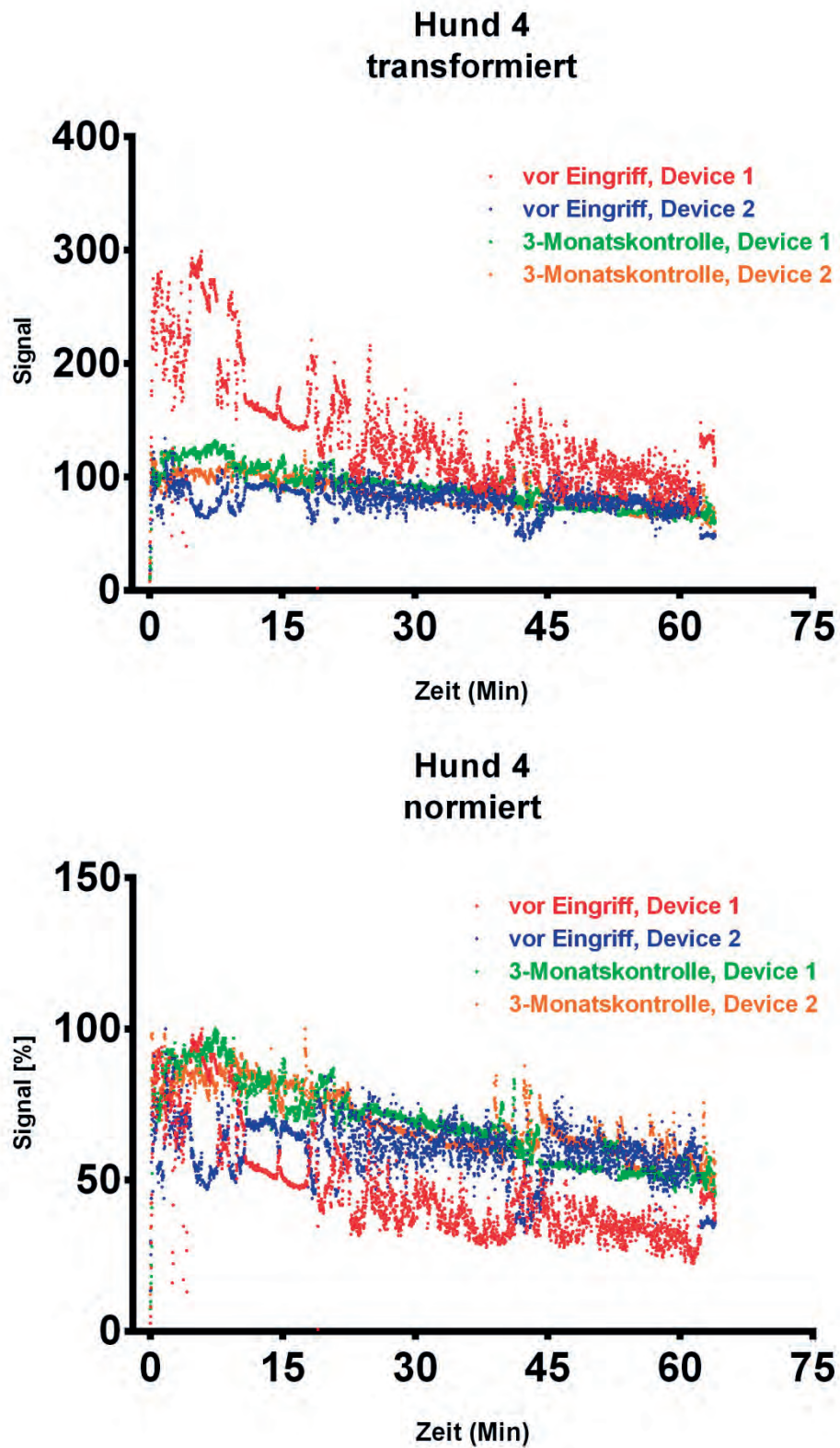
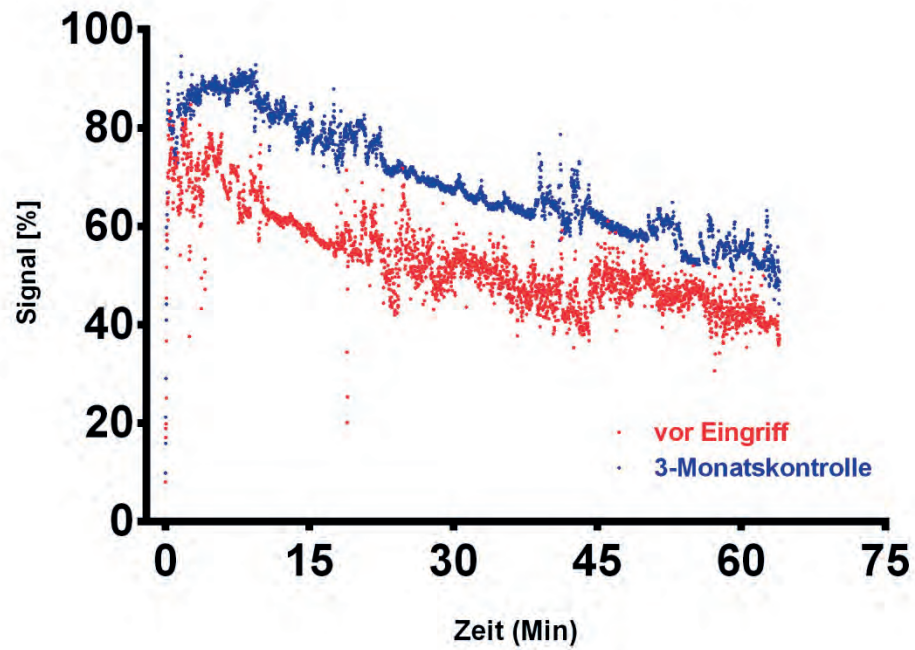


Abbildung IX-5: Hund 4 (offener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 4
gemittelte Eliminationskurve



Hund 4
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

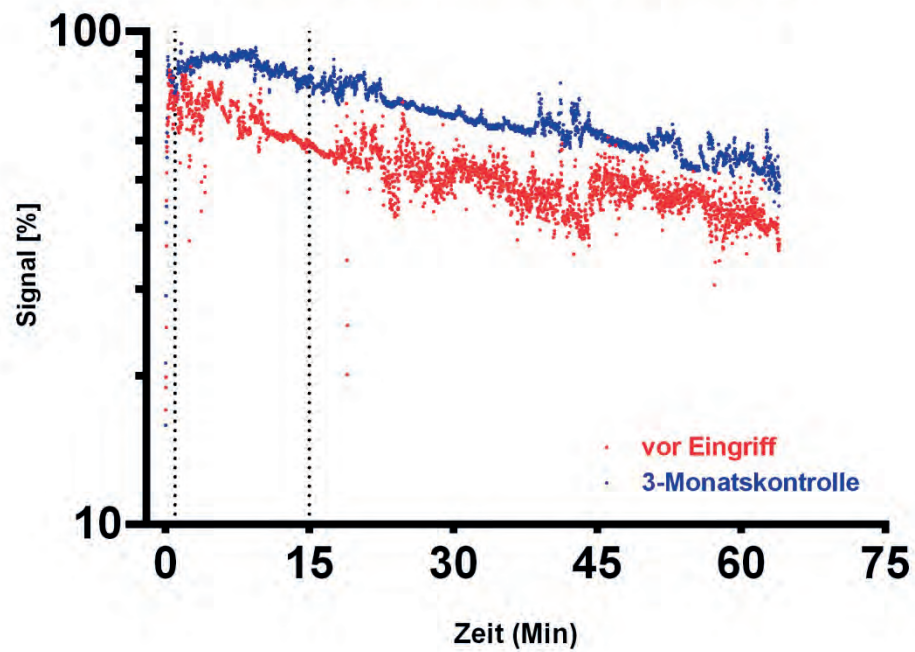
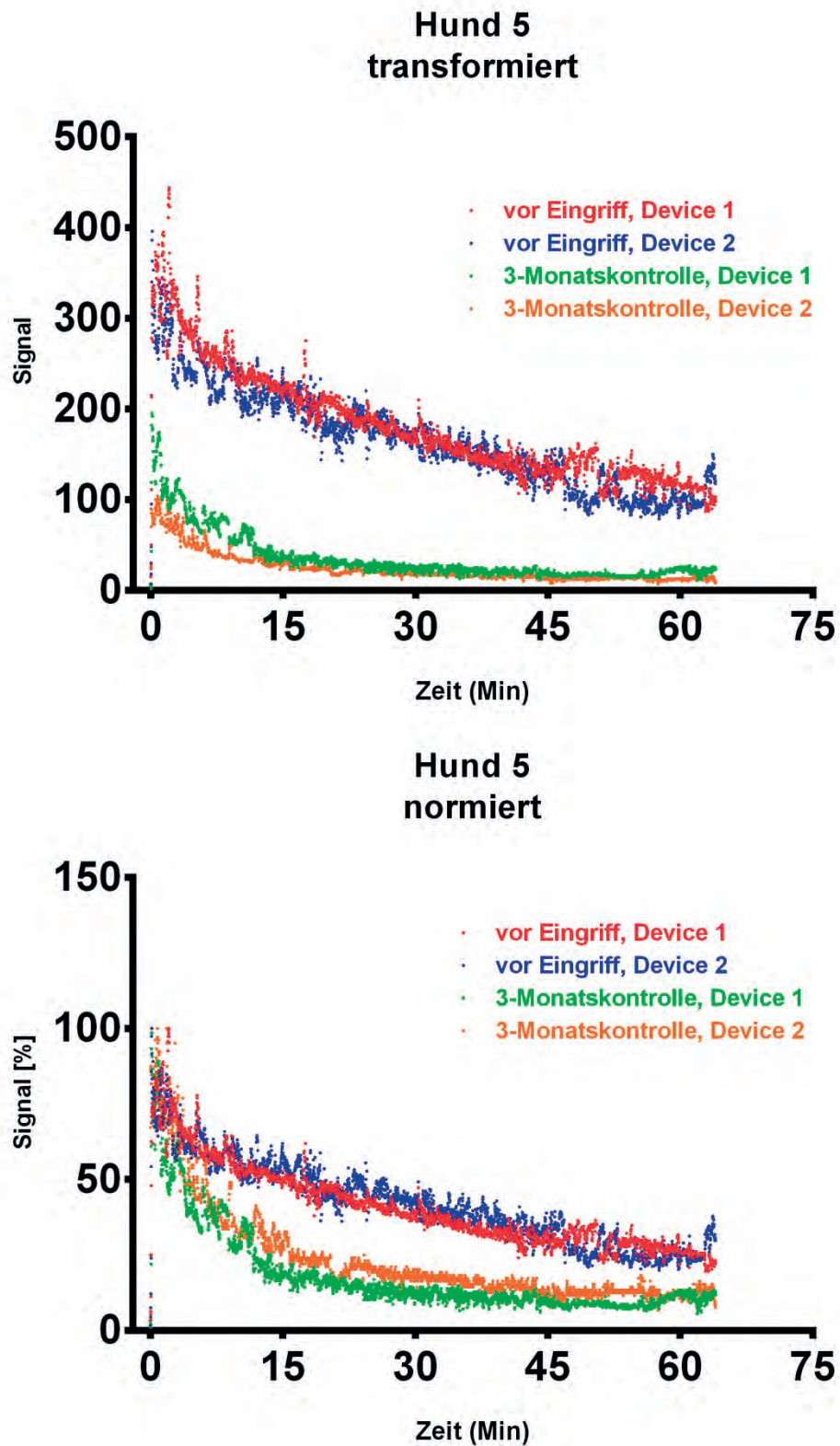
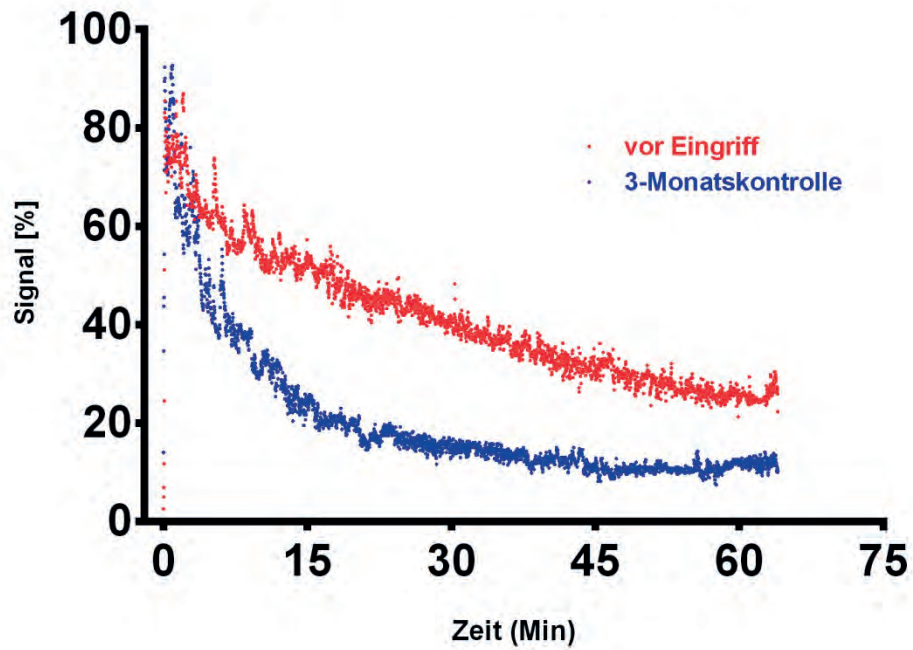


Abbildung IX-6: Hund 5 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 5
gemittelte Eliminationskurve



Hund 5
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

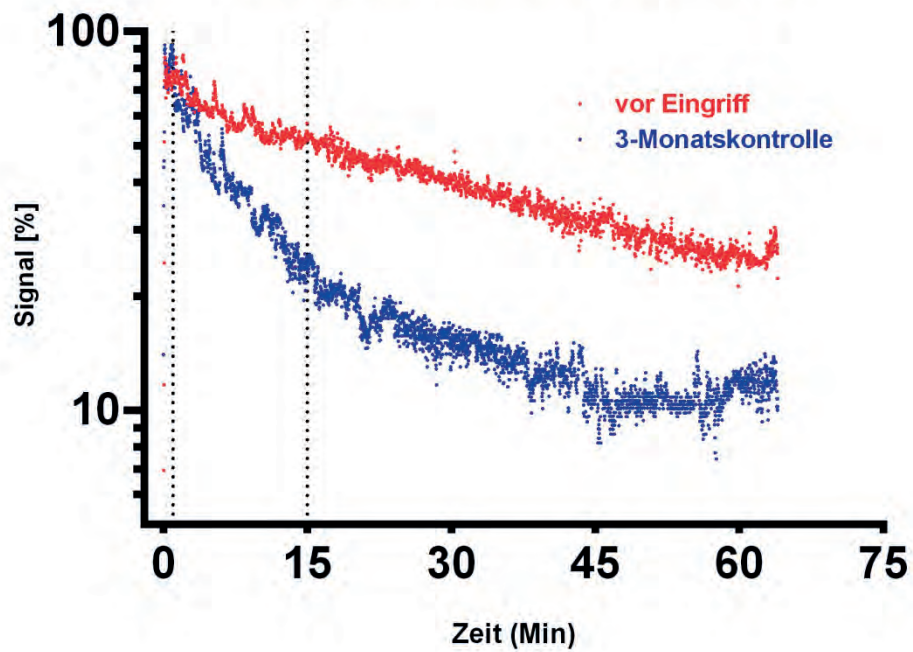
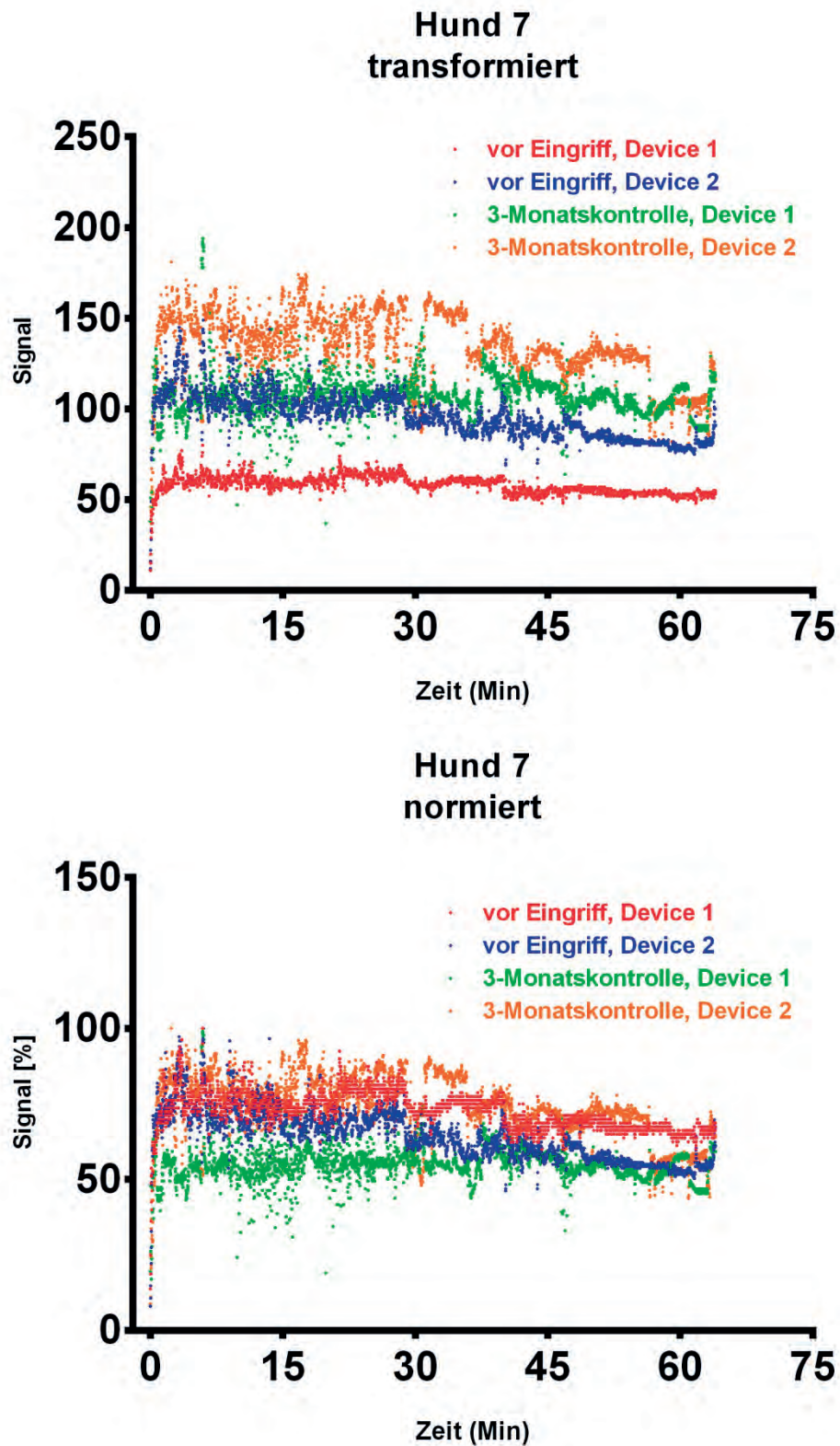
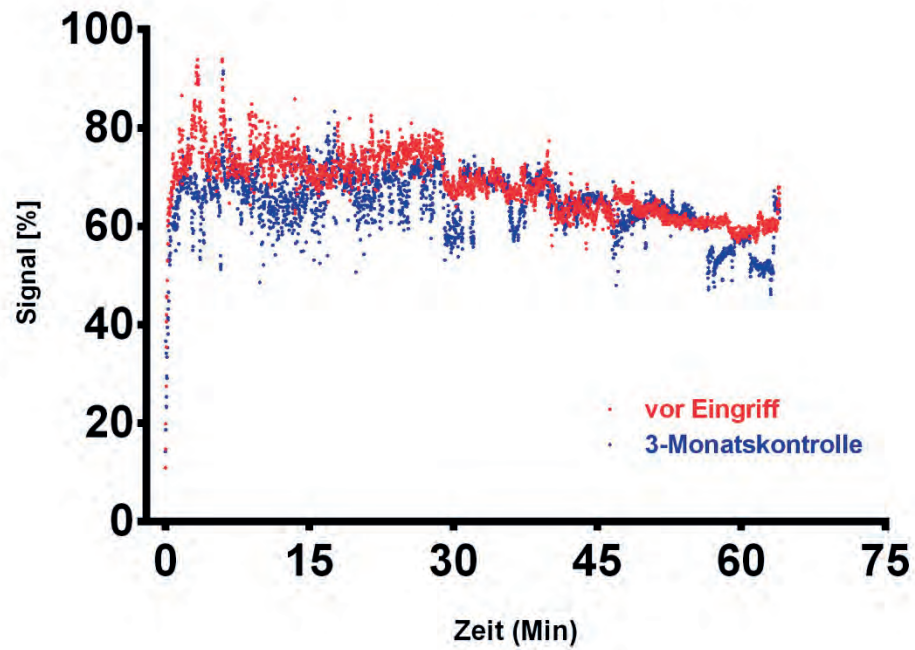


Abbildung IX-7: Hund 7 (offener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 7
gemittelte Eliminationskurve



Hund 7
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

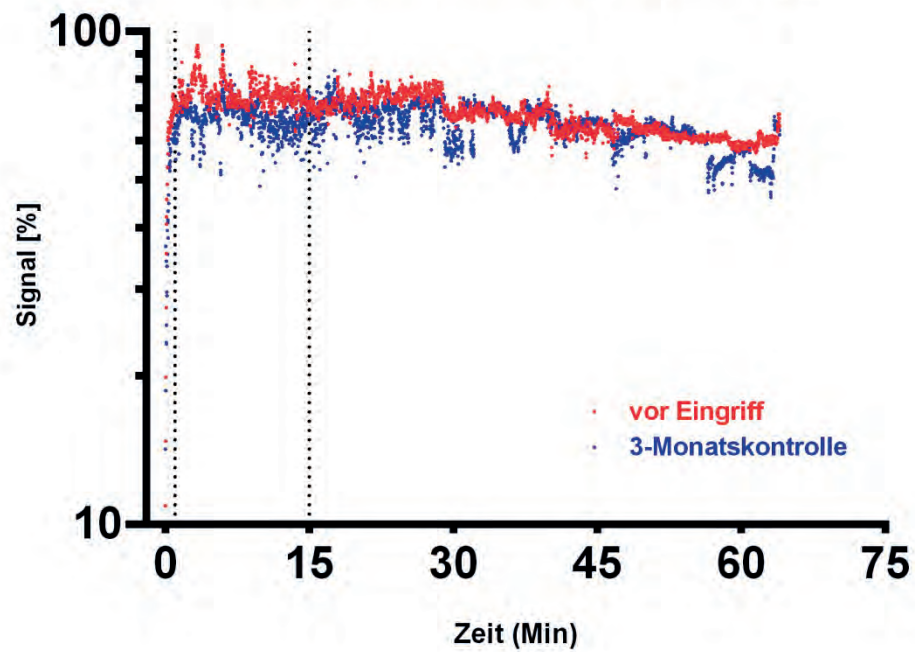
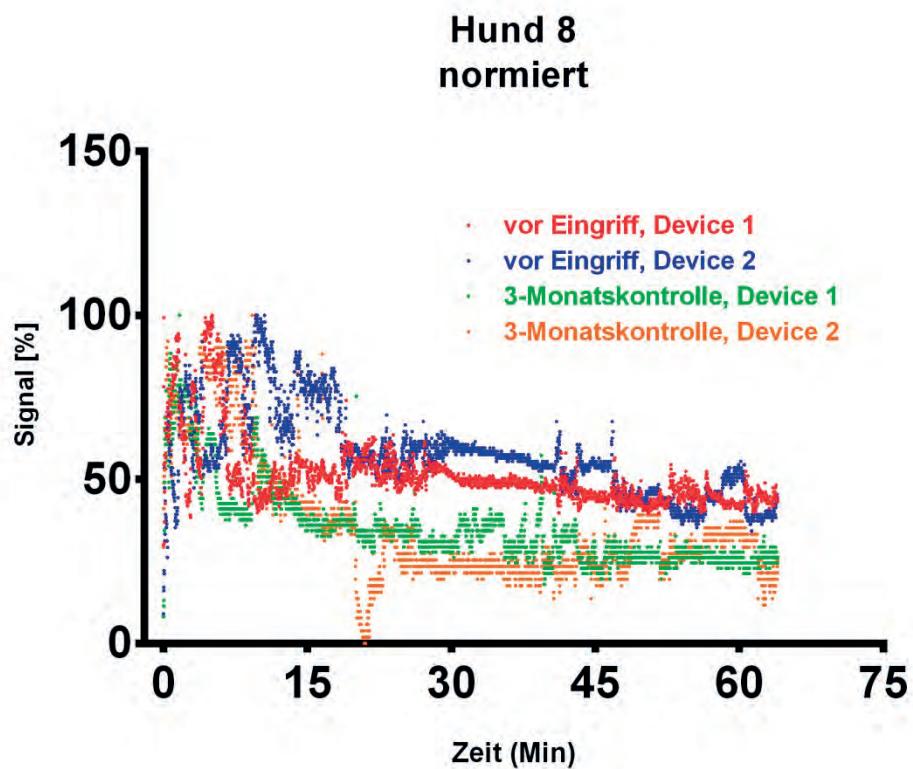
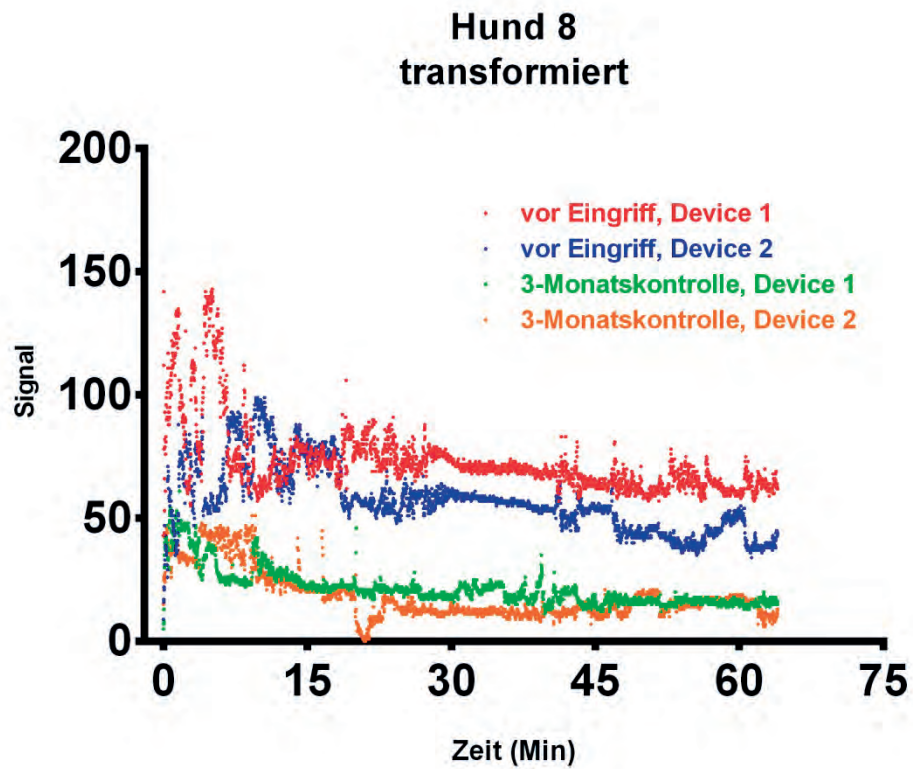
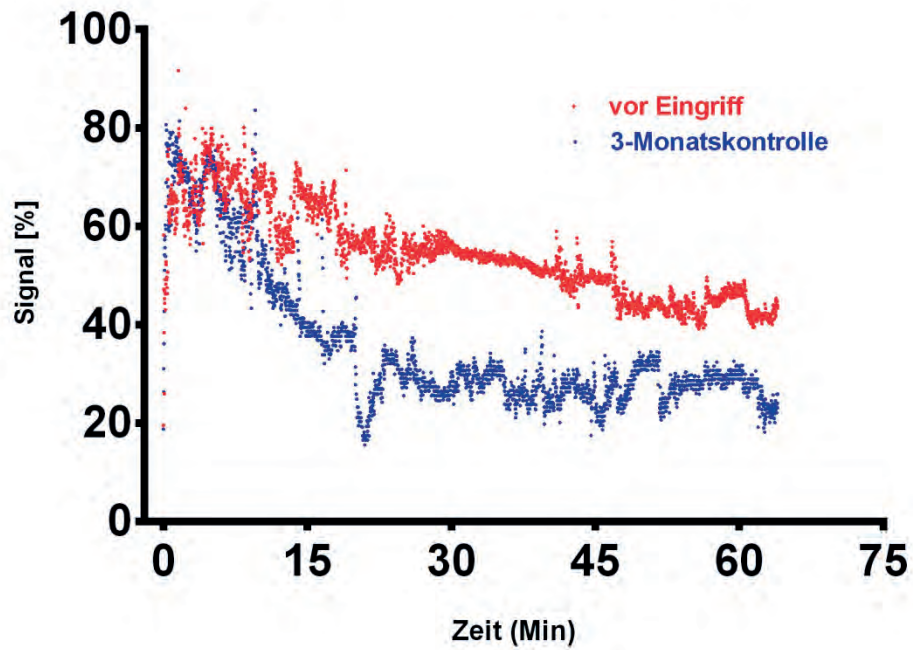


Abbildung IX-8: Hund 8 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 8
gemittelte Eliminationskurve



Hund 8
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

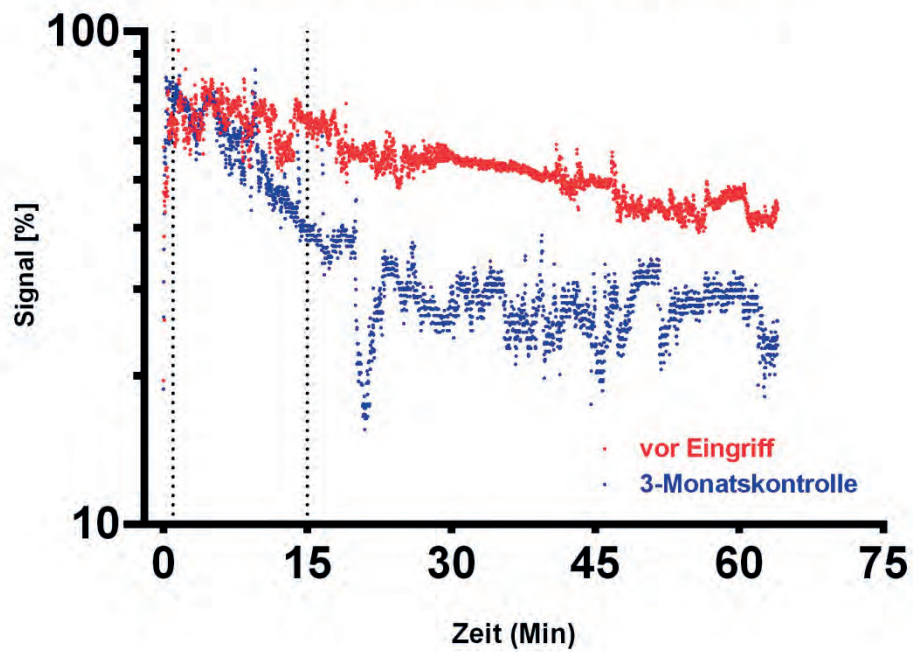
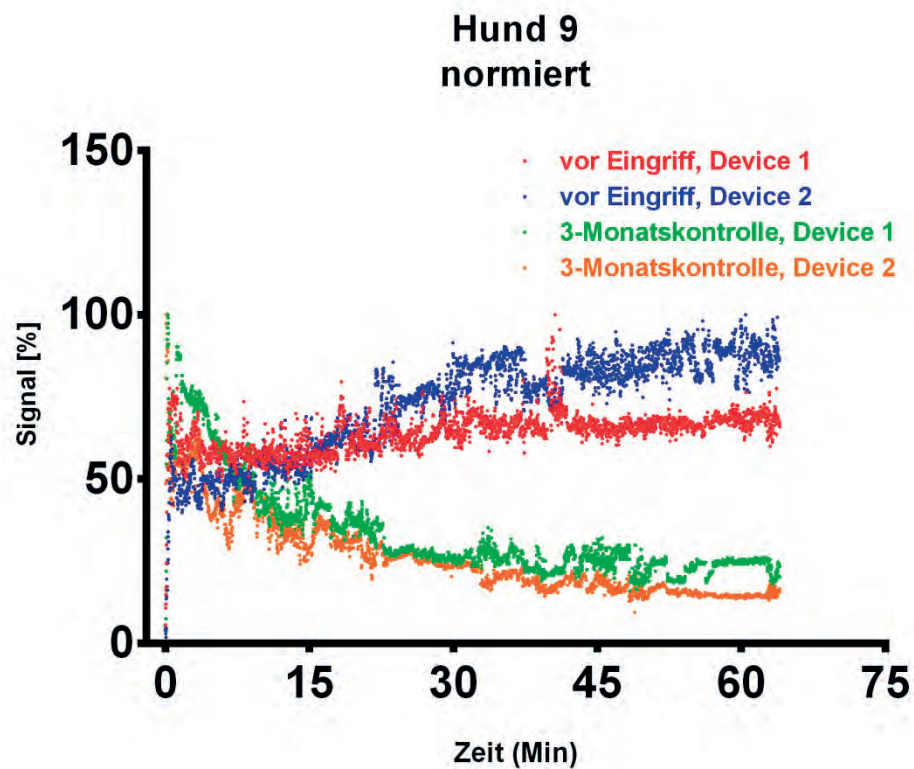
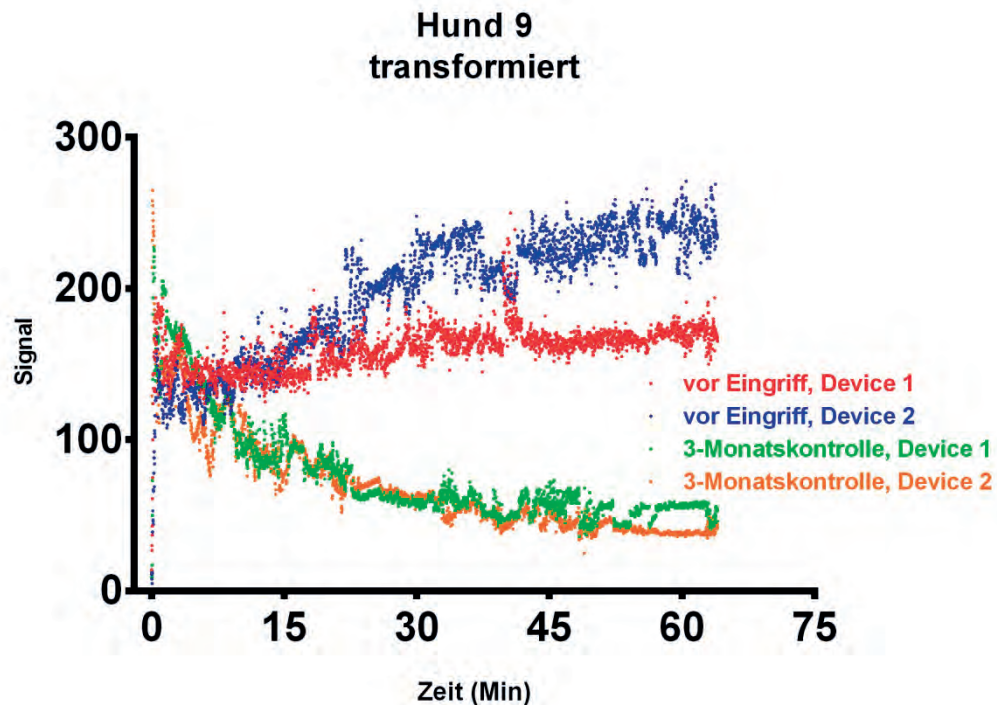
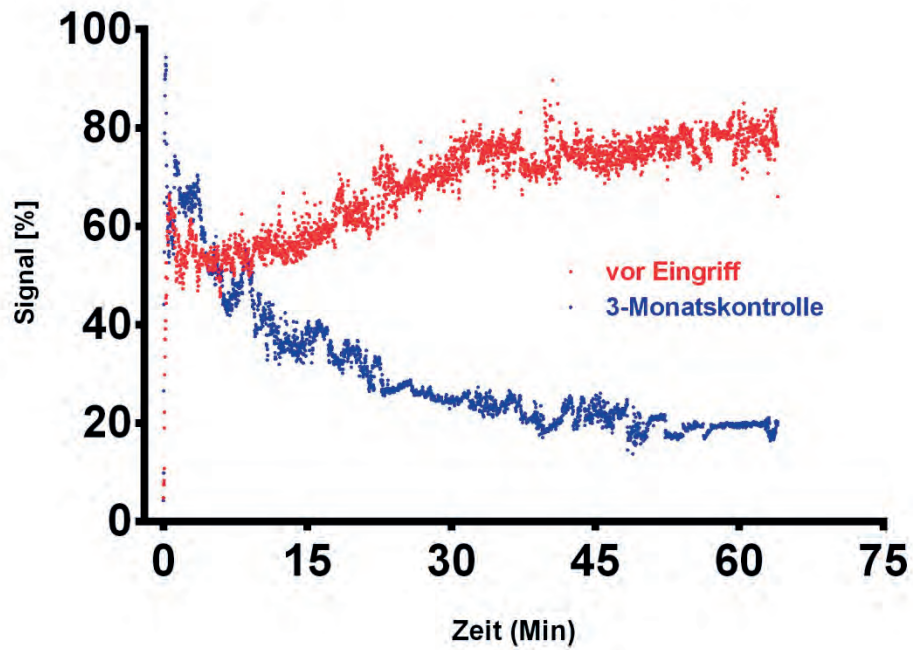


Abbildung IX-9: Hund 9 (verschlossener PSS bei Dreimonatskontrolle), schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 9
gemittelte Eliminationskurve



Hund 9
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

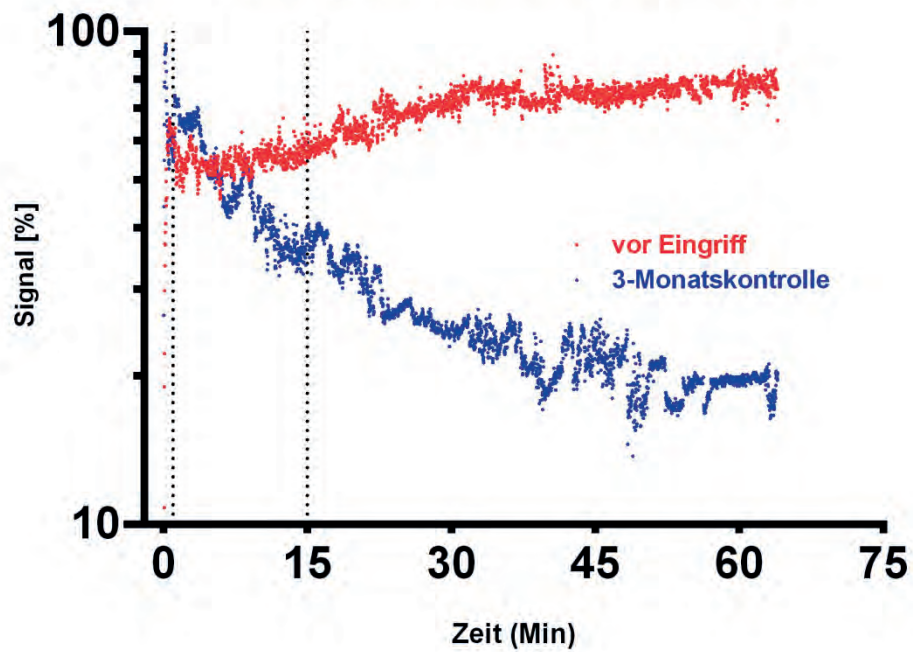
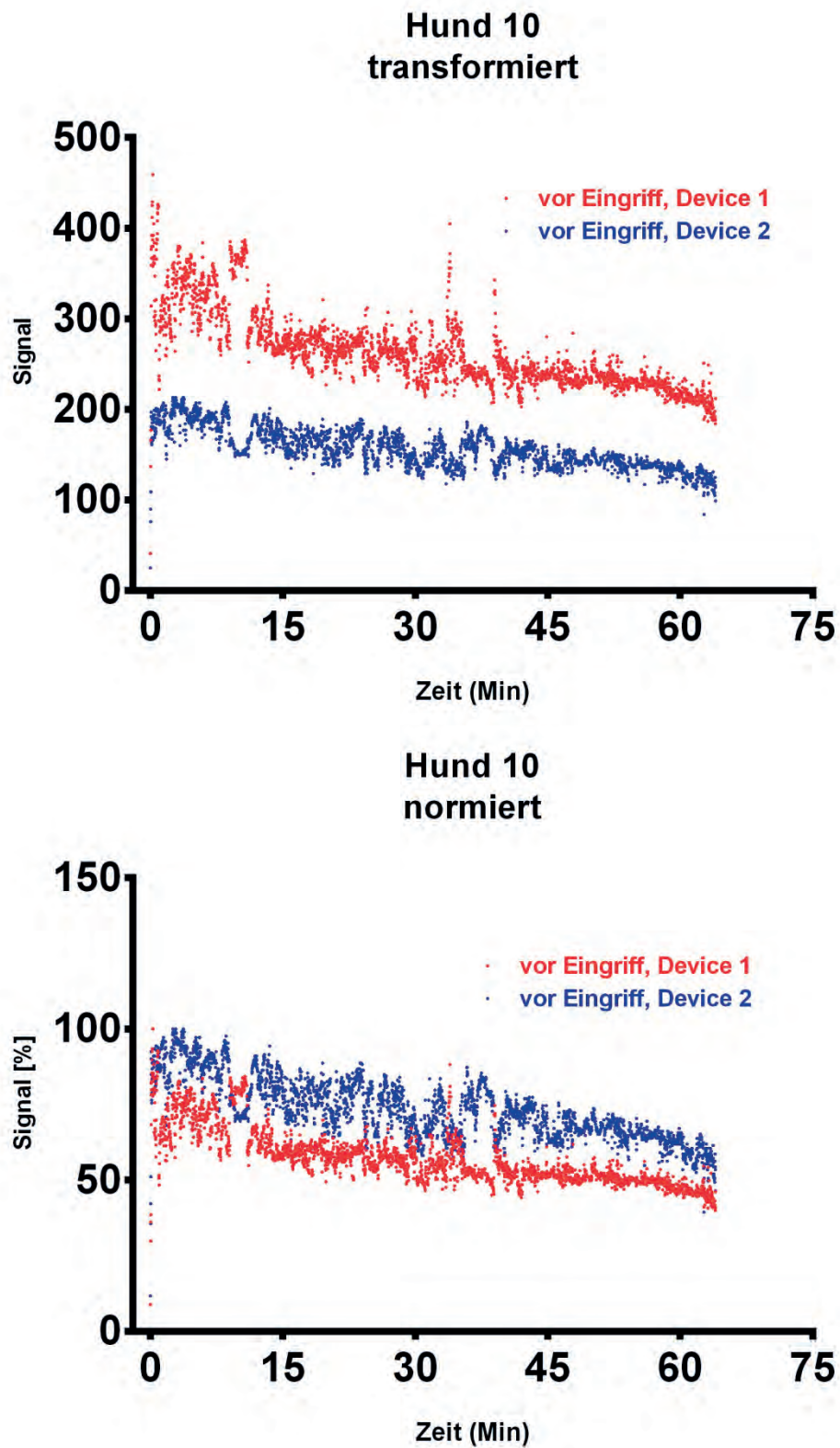
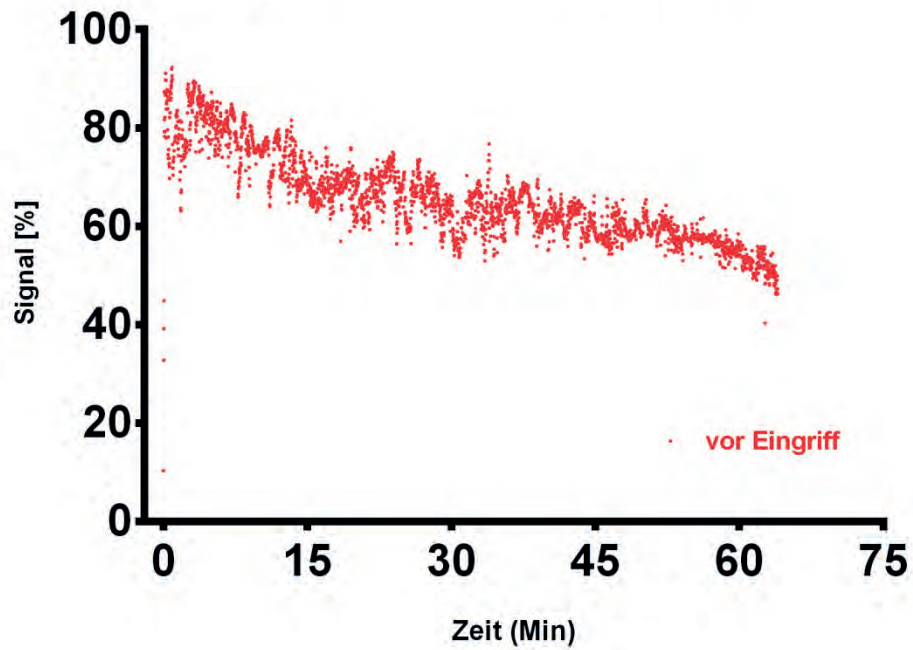


Abbildung IX-10: Hund 10, schrittweise Bearbeitung der transkutan gemessenen ICG-Eliminationskurve

lineare Transformation auf Niveau des Backgroundes, Normierung, Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen (gemittelte Eliminationskurve) in dezimaler und semilogarithmischer Darstellung



Hund 10
gemittelte Eliminationskurve



Hund 10
gemittelte Eliminationskurve
semilogarithmische Darstellung

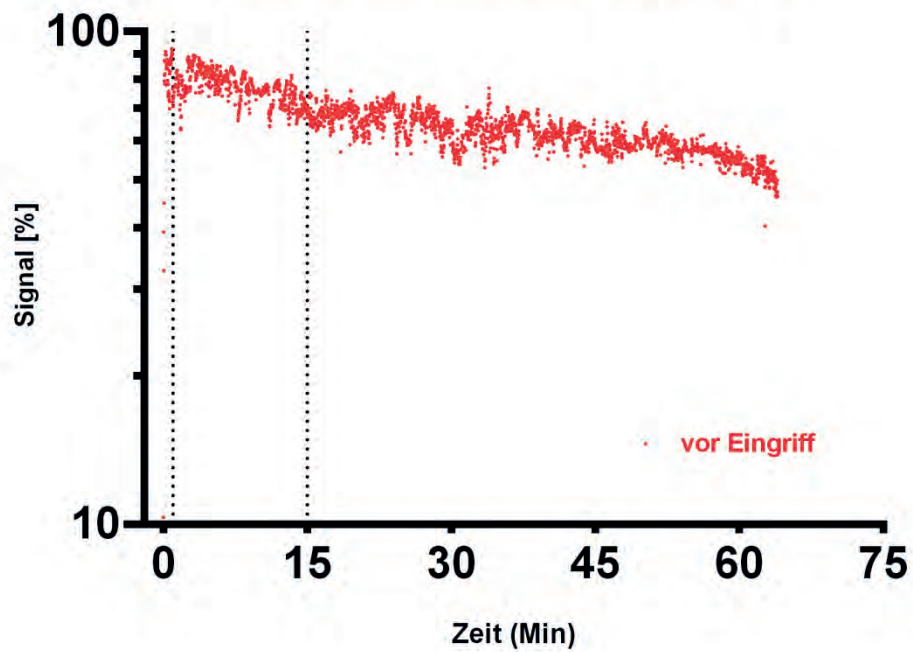
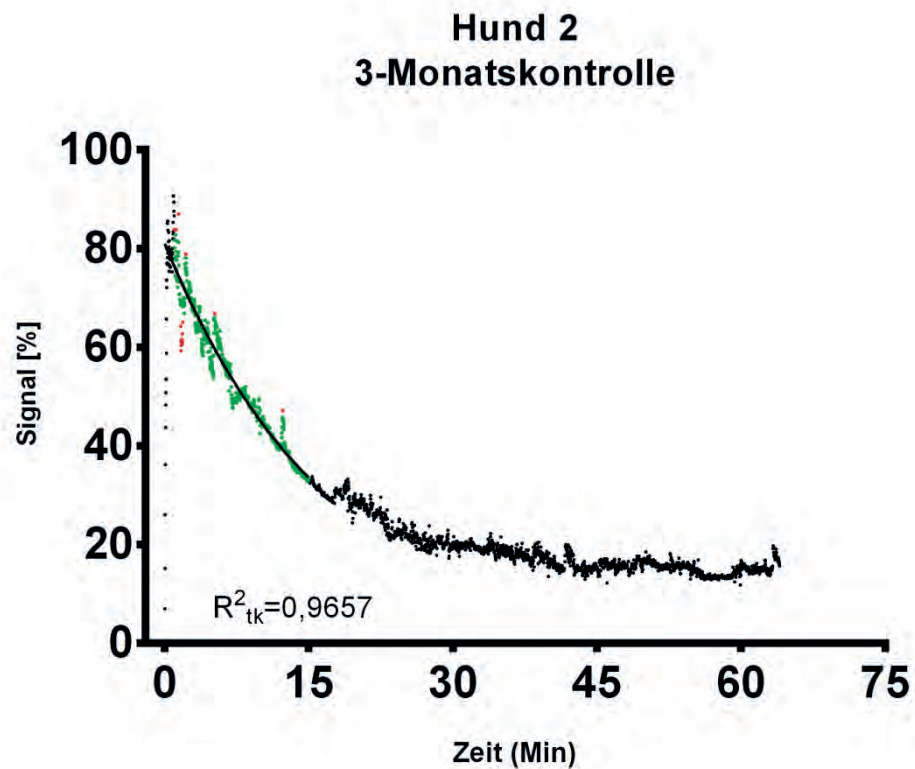
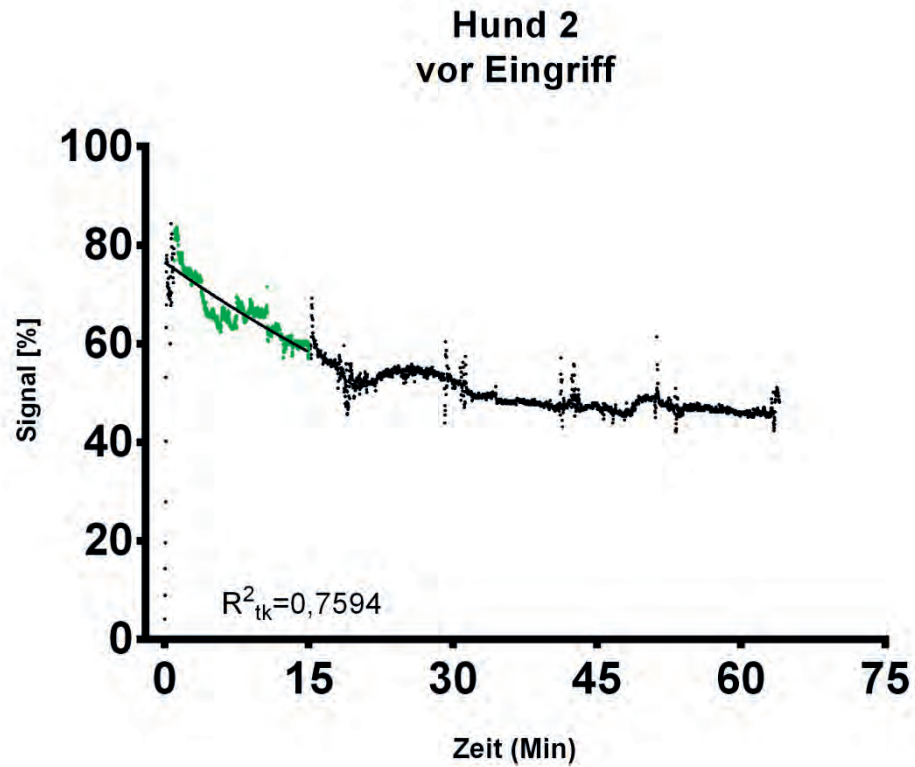
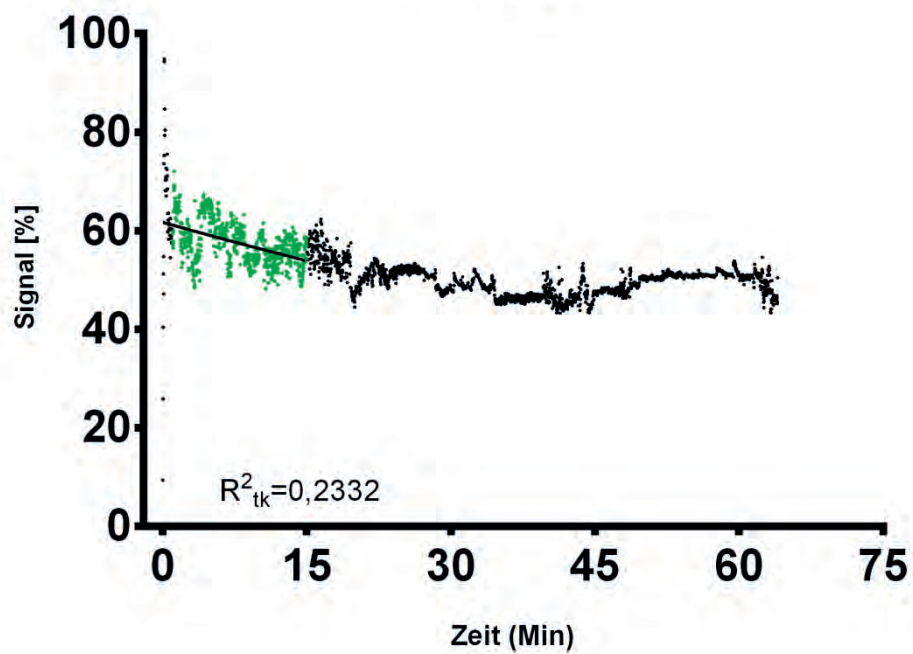


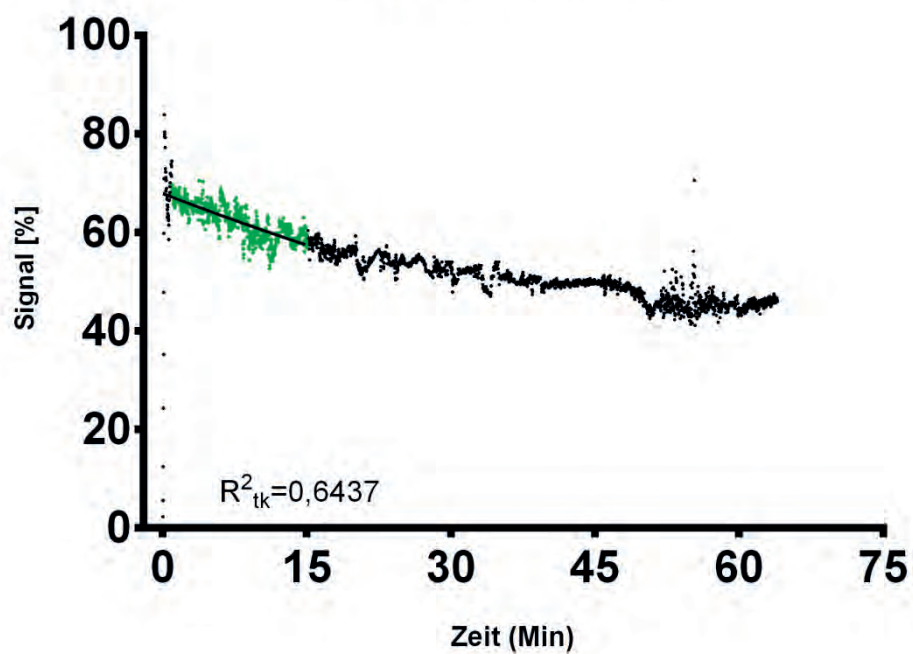
Abbildung IX-11: Hunde 2-5 und 7-10, graphische Darstellung der nichtlinearen Regression
monoexponentielles Fitting der transkutan gemessenen, gemittelten ICG-Eliminationskurve von 1-15
Minuten nach ICG-Injektion unter Angabe des Determinationskoeffizientes R^2_{tk} ,
rot: Ausreißer



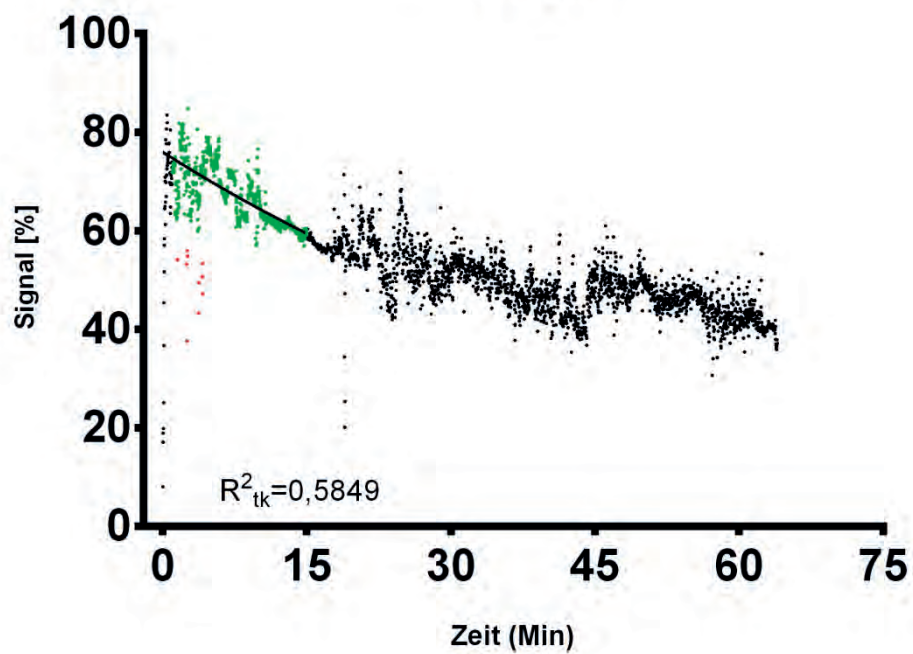
Hund 3 vor Eingriff



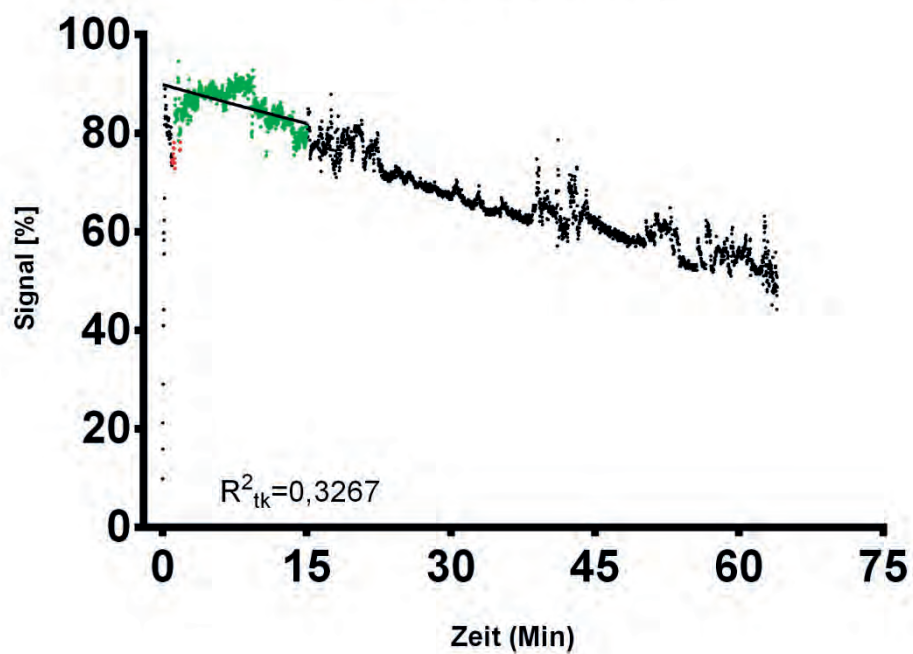
Hund 3 3-Monatskontrolle



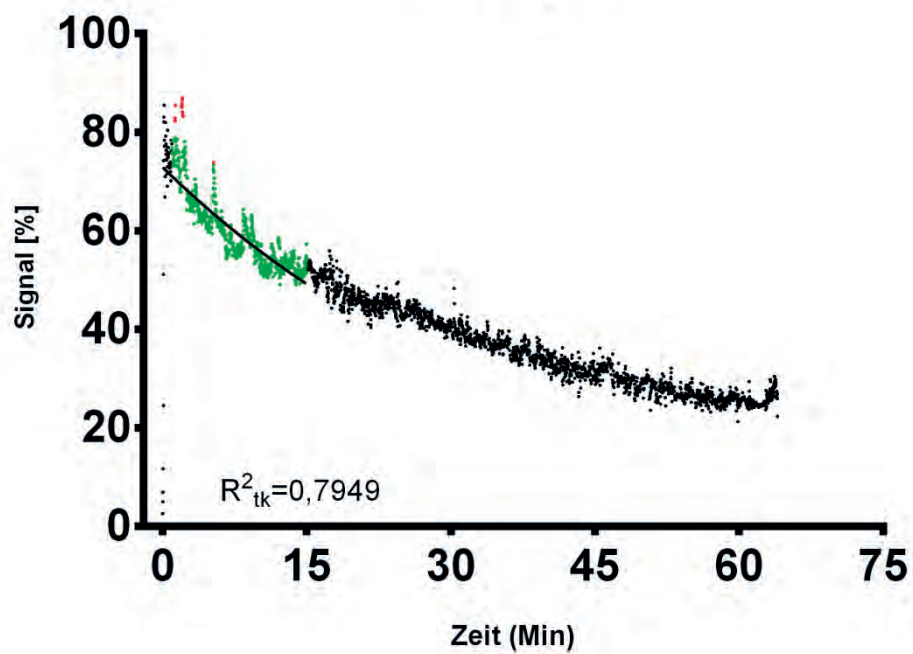
Hund 4 vor Eingriff



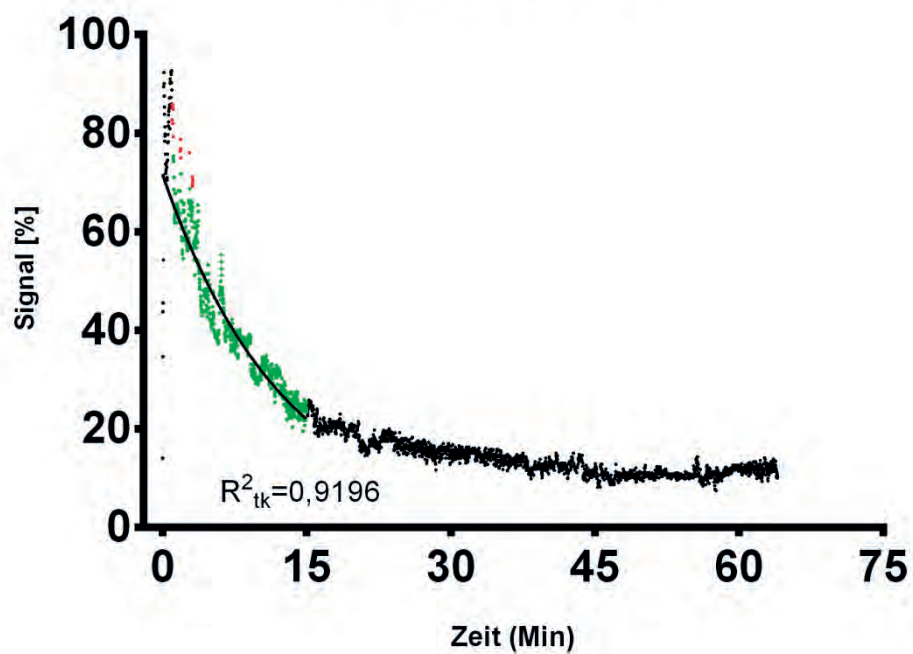
Hund 4 3-Monatskontrolle



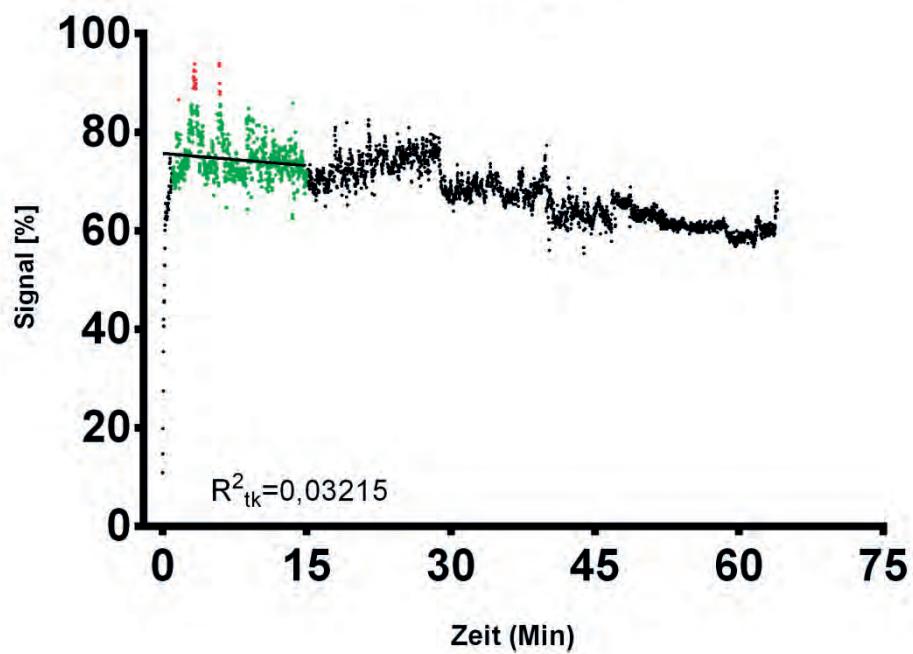
Hund 5 vor Eingriff



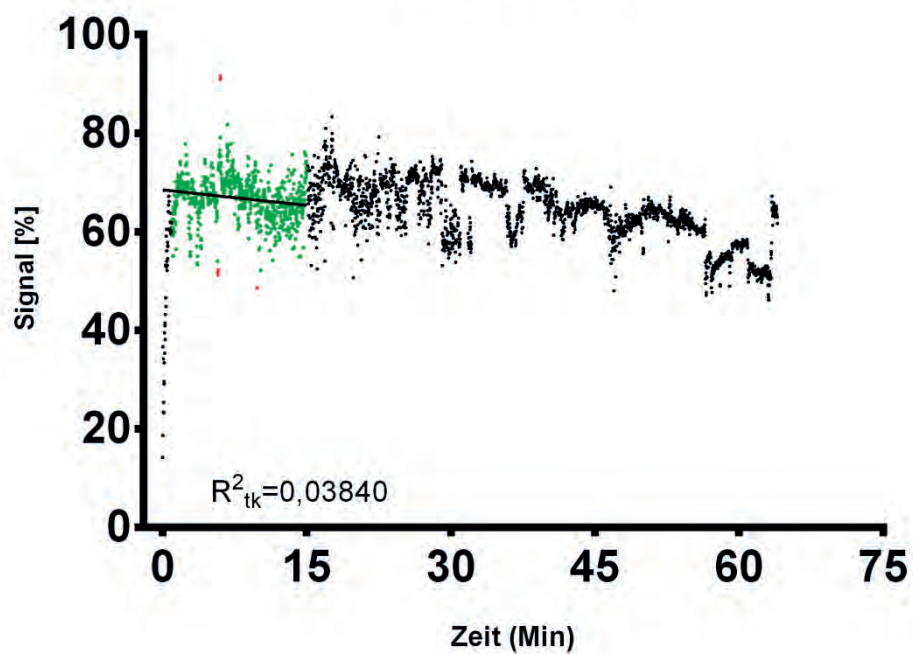
Hund 5 3-Monatskontrolle



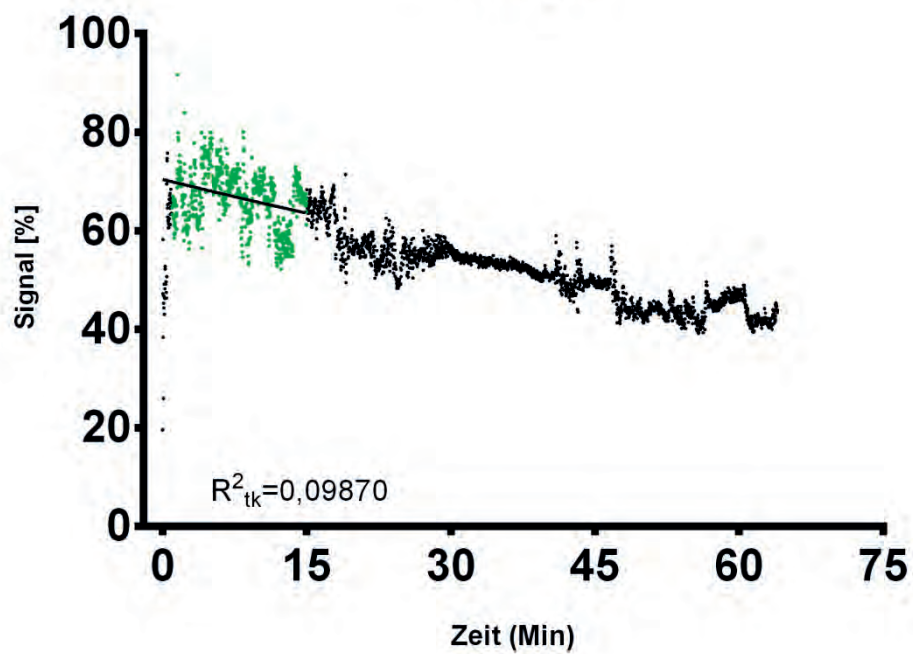
Hund 7 vor Eingriff



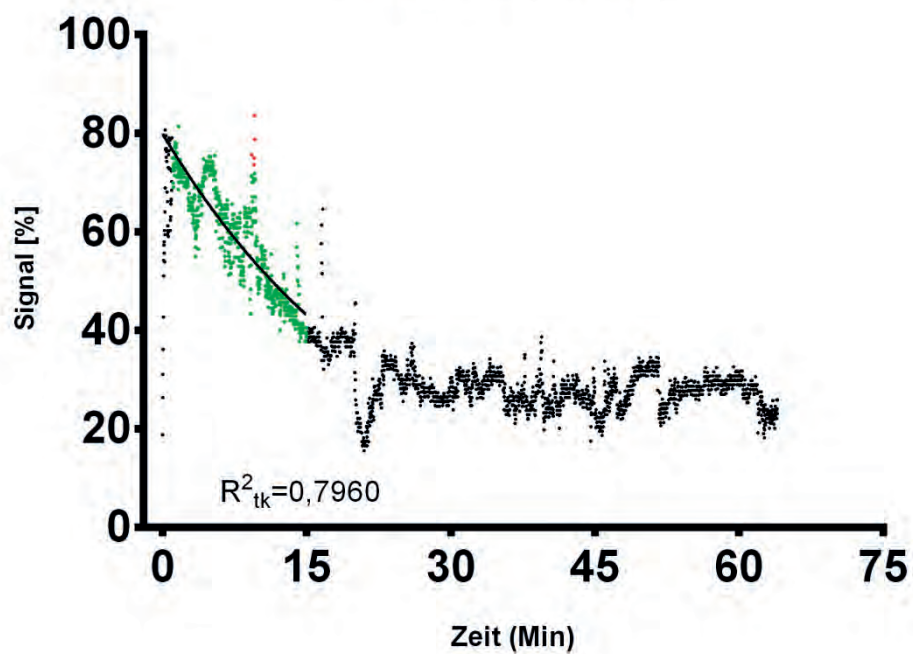
Hund 7 3-Monatskontrolle



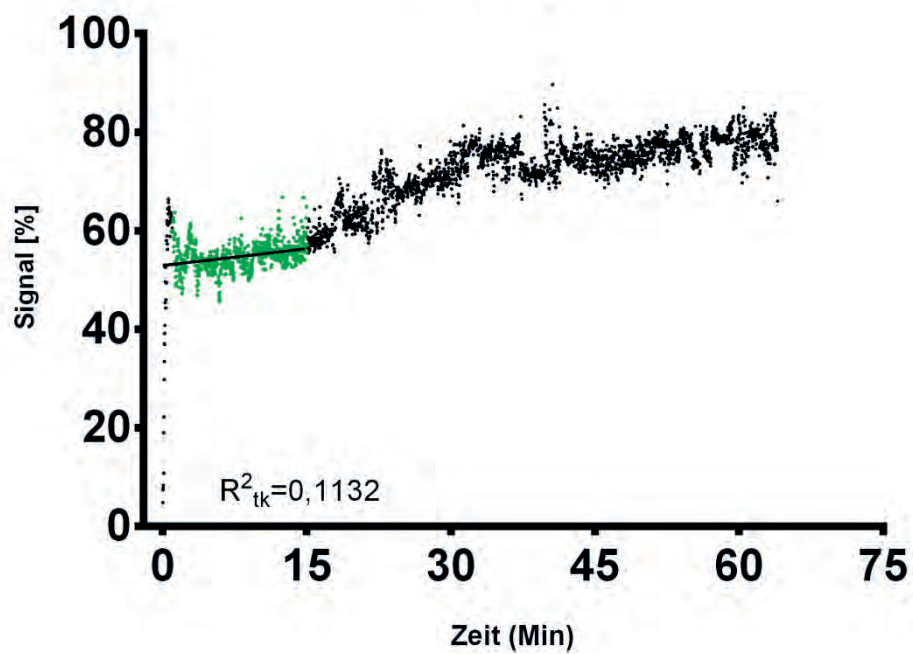
Hund 8 vor Eingriff



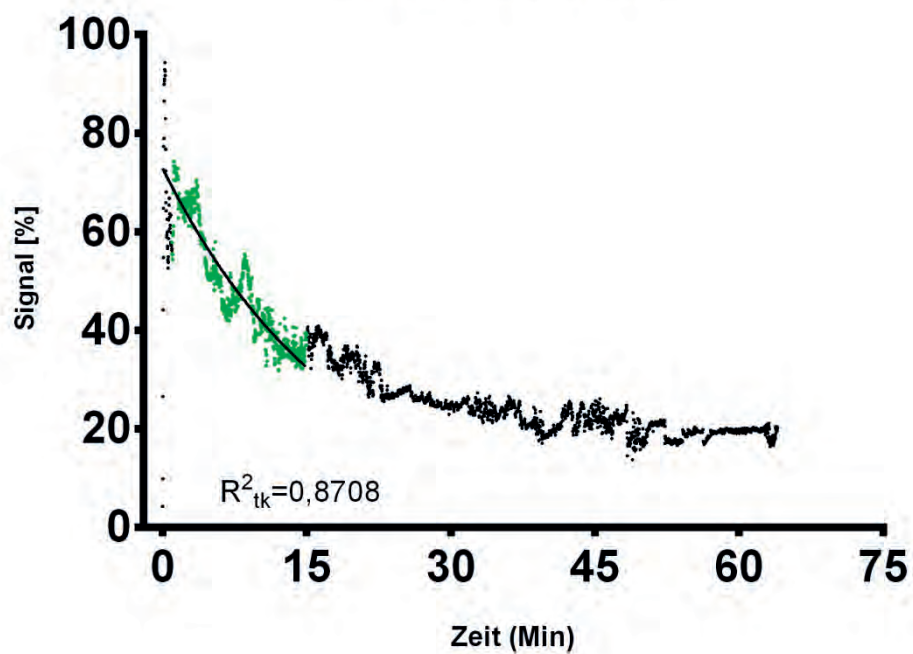
Hund 8 3-Monatskontrolle



Hund 9 vor Eingriff



Hund 9 3-Monatskontrolle



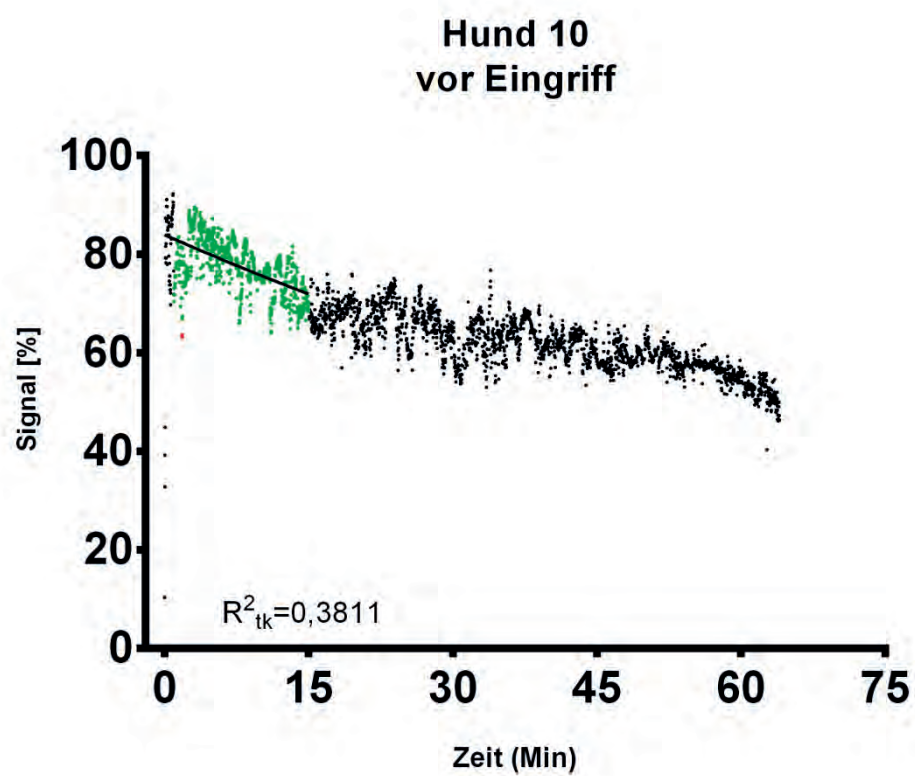
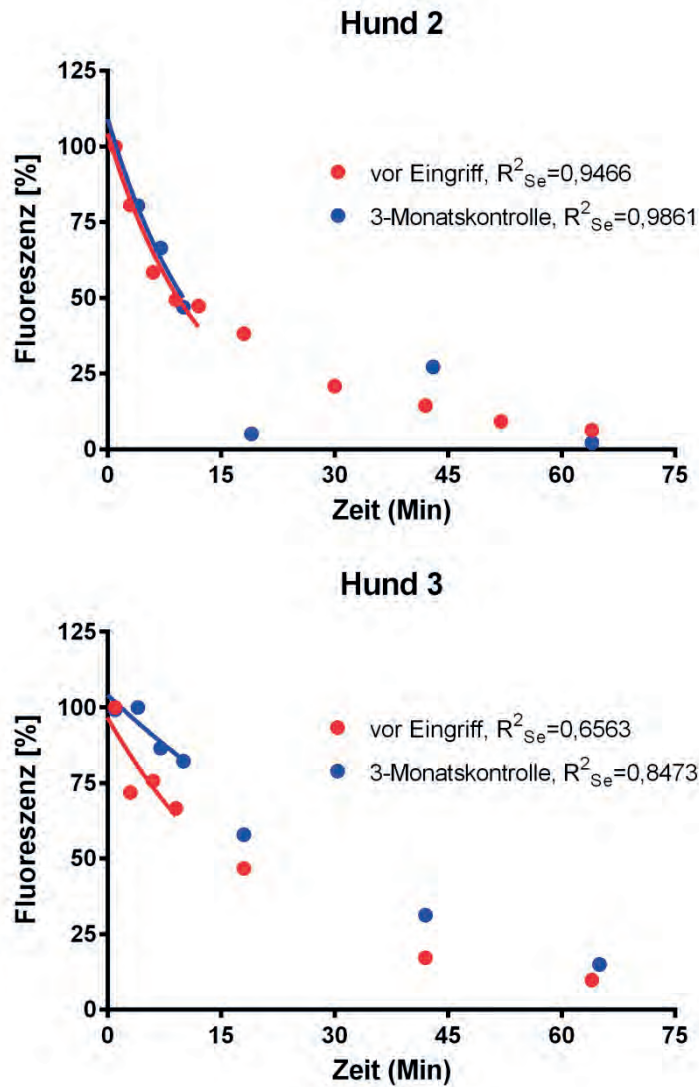
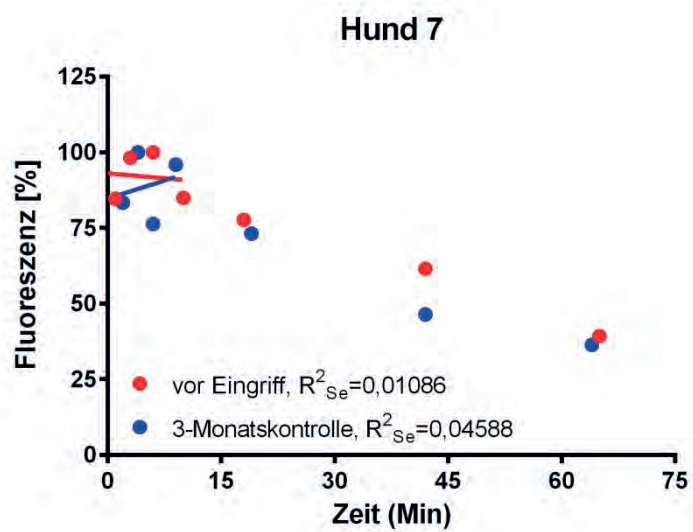
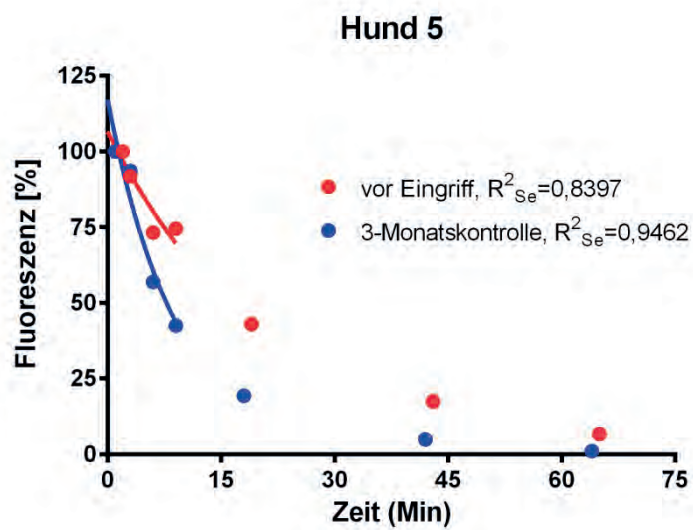
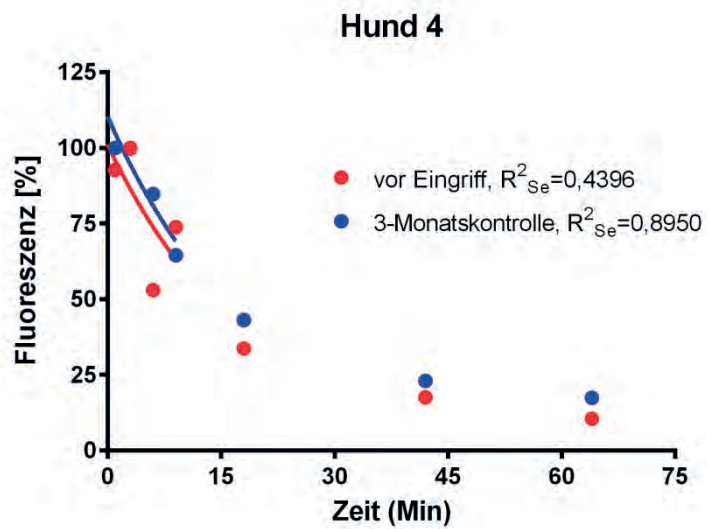
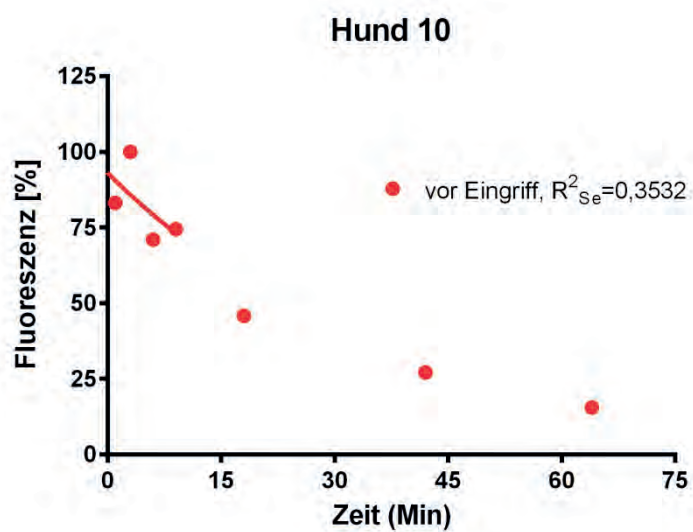
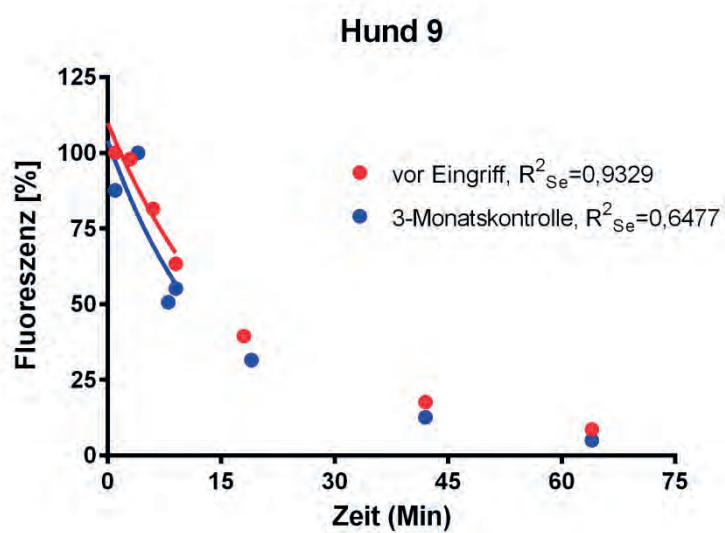
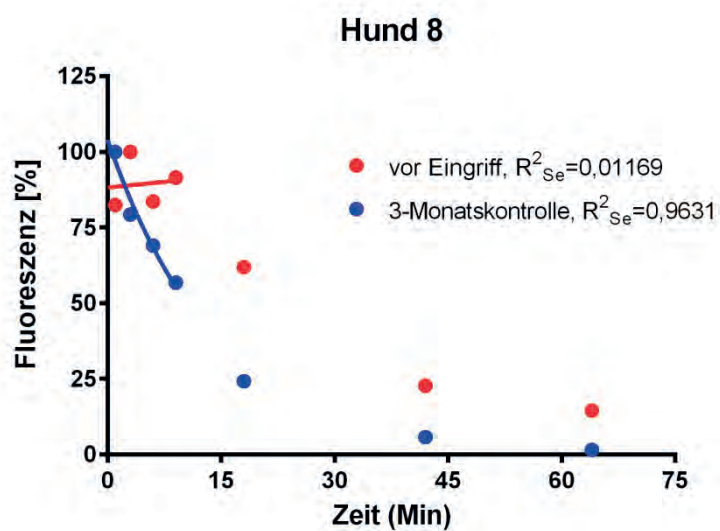


Abbildung IX-12: : Hunde 2-5 und 7-10, Serum-ICG-Elimination

nach linearer Transformation, Bildung des Mittelwertes aus dem Doppelansatz und Normierung, Kurve des monoexponentiellen Fittings von T_1 bis T_{15} eingezeichnet unter Angabe des Determinationskoeffizienten R^2_{Se}







Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Reto Neiger für die fachliche und persönliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation und die umfassende internistische Ausbildung, die er mir und meinen Kollegen in den letzten Jahren zukommen ließ. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen und ist bekannt für seine schnellen, aber dennoch gründlichen Korrekturen. Ich werde ihn als Chef und Mentor vermissen und bin dankbar für die Chance, von ihm zu lernen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Norbert Gretz und seinen Mitarbeitern, in deren Kooperation diese Dissertation entstanden ist, und Prof. Dr. Matthias Schneider, der es ermöglicht hat, Hunde mit extrahepatischem portosystemischem Shunt für die Studie zu akquirieren.

Ausdrücklich möchte ich meinen Kollegen danken, die weit mehr als nur das sind. Der Teamgeist und die gegenseitige Unterstützung haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Allen voran gehört mein Dank Johanna und Sina. Mit beiden verbindet mich mittlerweile eine tiefe Freundschaft, die hoffentlich auch über unserer gemeinsame Zeit in Gießen hinaus Bestand haben wird! Sie haben mir tatkräftig und unermüdlich bei der Datensammlung geholfen, und mich das Ziel nicht aus den Augen verlieren lassen. Und natürlich haben wir viele unvergessliche Momente gemeinsam erlebt!

Meine Eltern haben immer an mich geglaubt, und ohne dieses Vertrauen, ihre Liebe und die tiefe Verbundenheit hätte ich all das nicht schaffen können! Ich hoffe, dass ich in Zukunft endlich die Zeit finde, mich für diese großartige persönliche, und auch praktische Hilfe in allen Lebenslagen zu revanchieren.

Mein Freund Georg ist nun schon seit mehr als zwölf Jahren an meiner Seite, auch wenn wir den überwiegenden Teil dieser Zeit an verschiedenen Orten verbracht haben. Auch wenn – oder vielleicht auch gerade weil – du mit Medizin nichts am Hut hast, hast du mich immer unterstützt in meinen Entscheidungen. Du bist mein Anker, erdest mich und zeigst mir, worauf es wirklich ankommt. Auf dich kann ich mich immer verlassen. Ich freue mich unendlich auf die kommende, gemeinsame Zeit! Dito!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6560-7



9 783835 196560 7